Aus dem Zentralinstitut für Biochemie und Biophysik
der Freien Universität Berlin

DIE WIRKUNG VON PARATHORMON AUF DIE CARBOANHYDRASEAKTIVITÄT IN DER NIERE

Inaugural-Dissertation
zur
Erlangung der medizinischen Doktorwürde
an den Medizinischen Fachbereichen
der Freien Universität Berlin

vorgelegt von
Monika Holke
aus Berlin

1973

Aus dem Zentralinstitut für Biochemie und Biophysik
der Freien Universität Berlin

DIE WIRKUNG VON PARATHORMON AUF DIE CARBOANHYDRASEAKTIVITÄT IN DER NIERE

Inaugural-Dissertation
zur
Erlangung der medizinischen Doktorwürde
an den Medizinischen Fachbereichen
der Freien Universität Berlin

vorgelegt von
Monika Holke
aus Berlin

Referent: Professor Dr. P. Siegmund

Korreferent: Professor Dr. H.-J. Dulce

UNIV.
LEIDEN
BIBL.

Gedruckt mit der Genehmigung der Medizinischen Fachbereiche
der Freien Universität Berlin

Promoviert am: 25. Juni 1973

Die vorliegende Arbeit wurde unter der Anleitung von Herrn Professor Dr. Peter Siegmund im Zentralinstitut für Biochemie und Biophysik der Freien Universität Berlin angefertigt.

Summary

Carbonic anhydrase activity in the kidneys of rats and cockerels is considerably enhanced by parathyroid hormone.

Both, the supernatant [105 000 g] as well as the microsomal carbonic anhydrase are activated.

The effect is not abolished by injection of actinomycin D one hour before the application of parathyroid hormone.

Injections of dibutyryl-cyclic-AMP [DBcAMP] also enhanced the carbonic anhydrase activity in the kidneys, but only in the supernatant, while the enzymatic activity of the microsomes is not significantly altered in cockerels and even diminished in rats.

The isoenzymes of the renal carbonic anhydrase of cockerels were separated by electrofocusing. Without any drug we got two main peaks separating the renal carbonic anhydrase of cockerels, and the first peak was the lower one.

After injection of parathyroid hormone we also got two main peaks, but here the second one was the much lower one.

Zusammenfassung

Parathormon erhöht die Carboanhydraseaktivität in der Niere von Ratten und Hühnern.

Die Carboanhydrase wird sowohl im 105 000 g-Überstand wie auch in der Mikrosomenfraktion aktiviert .

Dieser Effekt läßt sich nicht durch eine Actinomycin D-Injektion eine Stunde vor der Hormonapplikation unterdrücken .

Injiziert man Dibutyryl-cyklisches-AMP [DBcAMP], erhält man ebenfalls eine Erhöhung der Carboanhydraseaktivität in der Niere, allerdings nur im 105 000 g-Überstand. Dagegen wird die enzymatische Aktivität der mikrosomalen Carboanhydrase von Hühnernieren nicht signifikant gesteigert, die von Rattennieren sogar vermindert.

Mit Hilfe der Elektrofokussierung wurden die Isoenzyme der Nierencarboanhydrase von Hühnern aufgetrennt.

Bei den Kontrolltieren erhielten wir bei der Fraktionierung der Nierencarboanhydrase von Hühnern zwei Hauptfraktionen, von denen die erste eine geringere Aktivität besaß. Nach Parathormoninjektion erhielten wir die gleichen zwei Hauptfraktionen, aber das Verhältnis der Aktivitäten war umgekehrt.

Digitized by the Internet Archive
in 2026

https://archive.org/details/IA41552710_0007

Die Wirkung von Parathormon auf die Carboanhydraseaktivität [1] in der Niere [2]

Einführung und Fragestellung

S. 11 ... Die Entdeckung der Carboanhydrase in den verschiedenen Organen und ihre physiologische Bedeutung.

S. 13 ... Die Hemmung der Parathormonwirkung auf das Serum-Calcium durch Azetazolamid.

S. 13 ... Der Zusammenhang zwischen Parathormon und cAMP.

S. 14 ... Die Rolle des cAMP bei Hormonwirkungen.

S. 15 ... Fragestellung zum Thema Parathormon - Carboanhydrase.

Ergebnisse der eigenen Versuche

S. 16 ... Die Parathormonwirkung auf die Carboanhydraseaktivität in der Niere.

S. 20 ... Der Einfluß von cAMP auf die Carboanhydraseaktivität in der Niere.

S. 21 ... Blutkorrekturen der Nierenhomogenate.

S. 24 ... Parathormon - Actinomycin D.

S. 27 ... Tabellen und Erläuterungen zu den Versuchen.

S. 34 ... Auftrennung der Carboanhydrase in Hühnernierencytosol in ihre Isoenzyme.

1] Der systematische Name ist Carbonat-Hydro-Lyase.

2] Teile der Arbeit wurden auf dem 7. internat. FEBS-Kongress 1971 in Varna vorgetragen.

Diskussion

S. 39 ... Zum Mechanismus der Carboanhydraseaktivierung.

S. 40 ... Hypothetisches Schema der Parathormonwirkung auf die Carboanhydrase.

S. 41 ... cAMP und Proteinbiosynthese.

S. 44 ... Mögliche physiologische Bedeutung der Carboan= hydraseaktivierung nach Parathormon.

Material und Methoden

S. 47 ... Materialien

S. 48 ... Apparate

S. 49 ... Methoden

S. 50 ... Aufarbeitung der Nieren

S. 52 ... Bestimmung der Carboanhydraseaktivität

S. 57 ... Ermittlung der durch Blutreste bedingten Carbo= anhydraseaktivität.

S. 59 ... Calcium-Bestimmung

S. 61 ... Elektrofokussierung

S. 65 ... Elektrofokussierung in Acrylamidgelen

S. 66 ... Disc-Elektrophorese

Literaturverzeichnis

Einführung und Fragestellung

Die Carboanhydrase ist ein intrazelluläres Enzym, das 1933 von MELDROUM und ROUGHTON aus Erythrocyten isoliert wurde. Es enthält ein Atom Zink pro Molekül, nach dessen Abspaltung das Enzym inaktiviert ist.

Die Carboanhydrase katalysiert die reversible Spaltung von

$H_2CO_3 \rightleftharpoons H_2O + CO_2$.

In den Erythrocyten wird die Kohlensäure zu 2/3 in HCO_3^- umgewandelt. In der Lunge kann dann beim Durchfluß des Blutes durch die Lungenkapillaren, nach pH-Erniedrigung durch die Oxygenierung von Hämoglobin, unter Mitwirkung der Carbo= anhydrase eine schnelle CO_2-Abgabe aus dem Blut in die Alveolarluft vonstatten gehen [ROUGHTON 1933].

1939 wiesen DAVENPORT und FISHER die Carboanhydrase in den Belegzellen der Magenschleimhaut nach. Sie ist dort in 5-fach höherer Konzentration vorhanden als in den Erythro= cyten, [DAVENPORT 1939]. FELDBERG et. al. [1940] deutete die Rolle der Carboanhydrase bei der Säuresekretion in der Magenschleimhaut: Sie sorgt für eine genügende Ge= schwindigkeit der Kohlendioxydhydratation, damit die zu den sezernierten Wasserstoffionen in äquivalenter Menge anfallen= den Hydroxylionen sofort neutralisiert werden können. Dadurch wird der Zellinhalt vor zu starker Alkalisierung bewahrt.

1941 wurde die Carboanhydrase von DAVENPORT und WILHELMI in der Niere nachgewiesen. 1942 stellte HOEBER an isolierten Froschnieren fest, daß Sulfonamide, die die Carboanhydrase hemmen, gleichzeitig die Bildung eines sauren Urins verhindern. PITTS und ALEXANDER [1945] erklärten dann den Mechanismus für die Säuerung des Harns in den Nierentubuli: Die Natriumionen aus dem Tubuluslumen werden gegen die Wasserstoffionen aus der Zelle ausgetauscht, die Carboanhydrase sorgt durch rasche Nachlieferung von H^+ - Ionen für Konstanz des pH - Wertes in den Zellen.

ROSEN hat die Carboanhydrase in der Niere histochemisch lokalisiert. Für die Taube ist Carboanhydraseaktivität nur im ersten Teil des proximalen Tubulus nachgewiesen worden, bei der Ratte und beim Hund auch in den Sammelrohren.+

Auch die Knochenzellen enthalten beträchtliche Mengen an Carboanhydrase. Die Werte liegen hier zwar unter denen der Blut - und Nierencarboanhydrase, sind aber von derselben Größenordnung. [SIEGMUND et.al.1959 und DULCE,SIEGMUND,KÖRBER,SCHÜTTE 1960].

+ROSEN wies die Carboanhydrase nach der histochemischen Methode von HÄUSSLER [1958] nach.
Wir haben diese Methode in der Modifikation nach WISTRAND und RAO für die Gelelektrophorese in Acrylamidgelen verwandt.
Die Methode beruht auf einer Ausfällung von Cobaltcarbonat in den Carboanhydrase - haltigen Zonen, das anschließend in Cobaltsulfid überführt wird.
Wir erhielten mit dieser Methode immer nur schlecht reproduzierbare Ergebnisse.

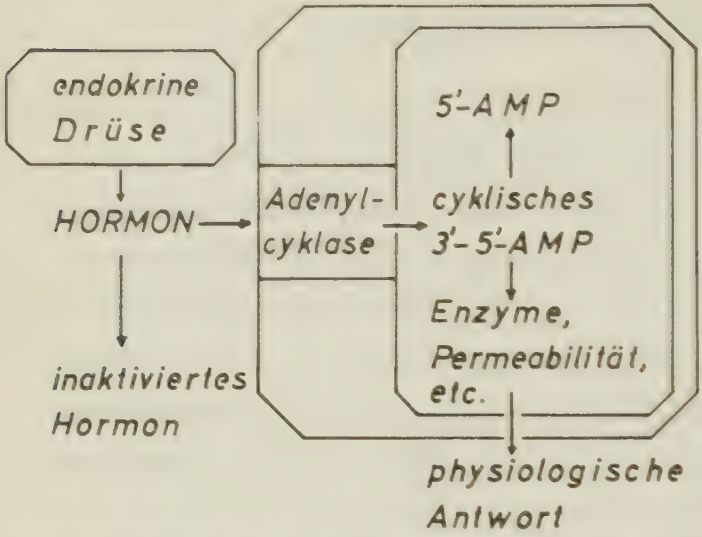
1965 zeigten SIEGMUND und BAUDITZ, daß der Einfluß von Parathormon auf den Plasma-Calcium-Spiegel bei Hühnern durch den Carboanhydraseinhibitor Azetazolamid verhindert wird.

KENNY zeigte 1969, daß entsprechende Versuche bei Säugetieren deswegen stets fehlgeschlagen waren, weil Azetazolamid hier nicht nur eine Hemmwirkung auf die Demineralisation, sondern auch auf die renale Calciumausscheidung ausübte, wodurch die Calciumsenkung im Plasma verhindert wurde. In nephrektomierten Ratten konnte KENNY dann demonstrieren, daß vorangehende Gaben von Azetazolamid die Wirkung von Parathormoninjektionen auf den Plasma Calcium-Spiegel verhindern.

MINKIN und JENNINGS | 1972 | wiesen nach, daß die durch Parathormon induzierte Knochenauflösung in einer Organkultur sich durch Sulfonamid-Inhibitoren der Carboanhydrase hemmen läßt. So machen auch in vitro Versuche die Mitwirkung von Carboanhydrase in der Kette des Systems der Knochenauflösung nach Parathormon wahrscheinlich.

1967 haben CHASE und AURBACH und 1967/68 WELLS und LLOYD gezeigt, daß nach Parathormongaben die intrazelluläre Konzentration von cyklischem Adenosinmonophosphat erhöht wird.

SUTHERLAND hat ein Schema über die Rolle von cyklischem Adenosinmonophosphat bei Hormonwirkungen aufgestellt

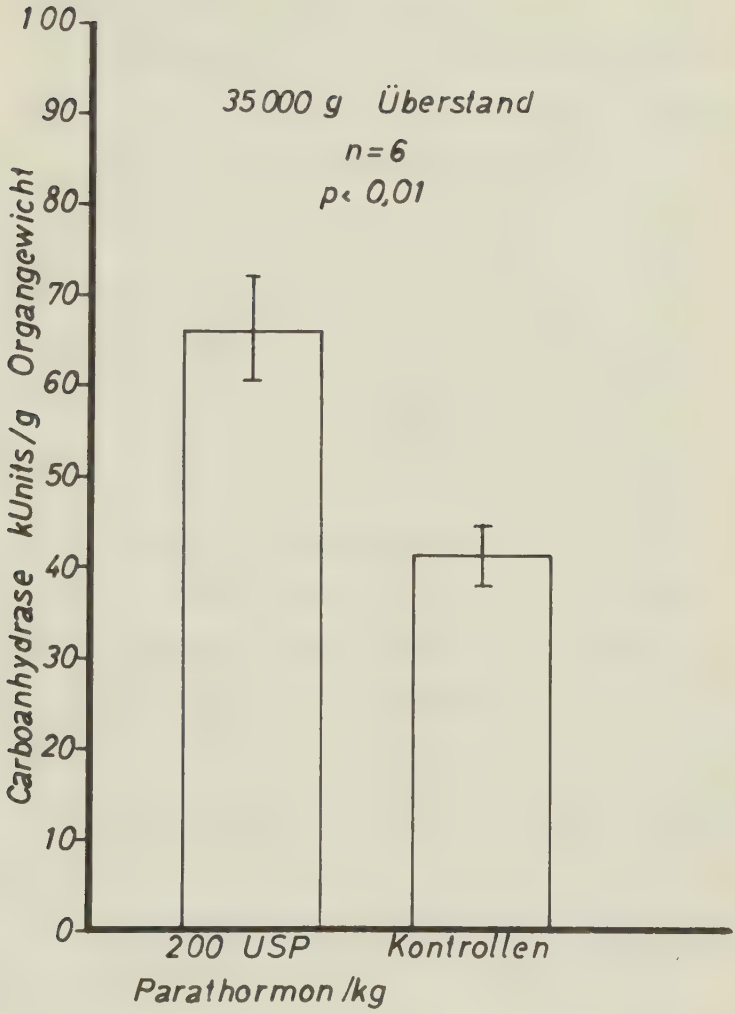


Es wird angenommen, daß dieses Schema allgemeine Gültigkeit besitzt, da bisher in den Fällen, in denen die Reaktionsfolge geklärt werden konnte, keine Abweichung davon gefunden wurde. Das Hormon ist der "First Messenger", ein Hormonrezeptor am jeweiligen Erfolgsorgan aktiviert die Adenylcyklase, welche den intrazellulären Spiegel von cyklischem Adenosinmonophosphat erhöht. Das cyklische Adenosinmonophosphat fungiert als "Second Messenger" und aktiviert die zellspezifischen Enzyme. Damit differiert das Endresultat von Zelle zu Zelle, da die Zellen unterschiedliche Enzymmuster enthalten. Bei der Aktivierung der zellspezifischen Enzyme durch das cAMP sind Proteinkinasen in die Kette der Enzymaktivierung eingeschaltet.

EIN ERFOLGSORGAN VON PARATHORMON IST DIE NIERE,
es steigert dort die Phosphatdiurese, -
DESHALB PRÜFTEN WIR, WELCHEN EINFLUSS PARATHOR
MON AUF DIE CARBOANHYDRASEAKTIVITÄT IN DER NIERE
HAT, UND OB DIESER EINFLUSS DURCH CYKLISCHES
ADENOSINMONOPHOSPHAT VERMITTELT WIRD!

Ergebnisse der eigenen Versuche

In einem ersten orientierenden Versuch wurden sechs jungen Hähnen von ca. 500 g Körpergewicht je 200 USP Parathormon pro kg Körpergewicht intravenös injiziert. Anderthalb Stunden nach der Parathormoninjektion wurden die Tiere getötet und zur Bestimmung der Carboanhydraseaktivität die Nieren entnommen und im Homogenisator nach POTTER zerkleinert. Die Carboanhydraseaktivität im 35 000 g-Überstand der Nierenhomogenate war nach Parathormoninjektionen gegenüber den Kontrollwerten durchschnittlich um 35% erhöht [Graphische Darstellung der Ergebnisse s. nächste Seite.]



Nierencarboanhydrase von Hähnchen

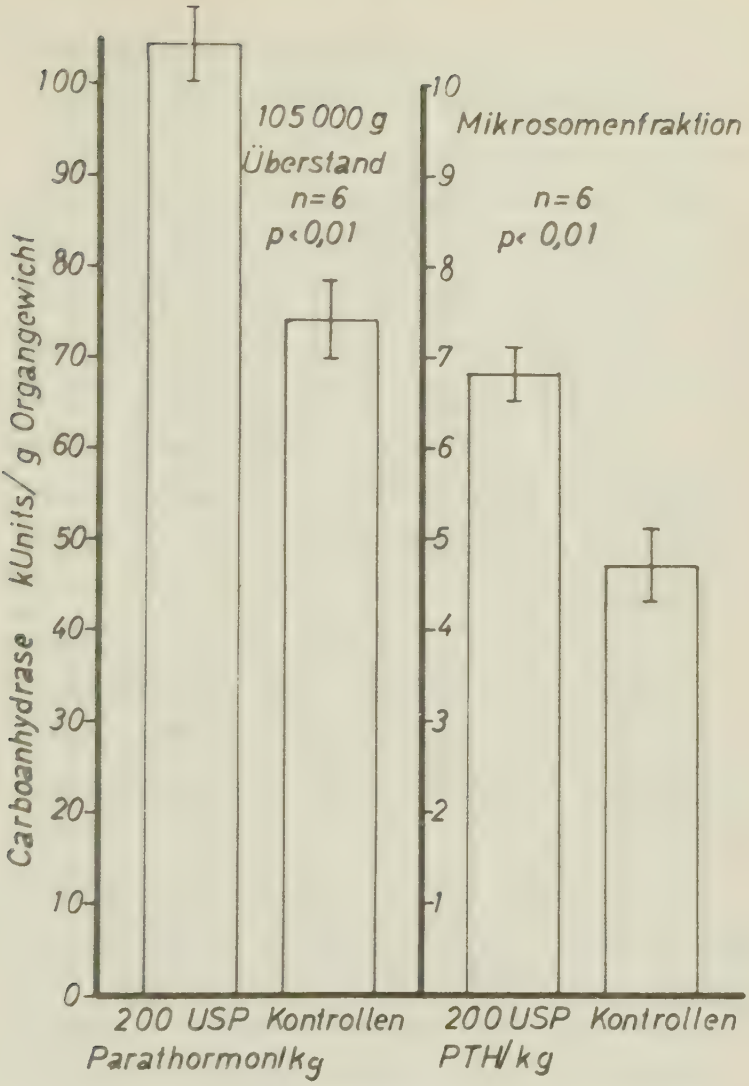
Da nach MAREN die Carboanhydrase in der Niere sowohl im Cytosol als auch in der Mikrosomenfraktion vorkommt, führten wir bei den folgenden Versuchen eine Fraktionierung nach HOGEBOOM, SCHNEIDER, PALADE [1947] durch.

Dabei wurde anderthalb Stunden nach intravenöser Injektion von 200 USP Parathormon pro kg Körpergewicht im 105 000 g-Überstand des Nierenhomogenates eine durchschnittliche Erhöhung der Carboanhydraseaktivität von 35% gegenüber den Normalwerten gefunden. Das gleiche gilt für die Mikrosomenfraktion, deren gesamte Carboanhydraseaktivität aber nicht mehr als 7% der im Cytosol gefundenen Aktivität beträgt.

[Zeichnung s. nächste Seite.]

Analoge Versuche an Ratten erbrachten trotz höherer Parathormondosis geringere Steigerungen der Enzymaktivität.

Zwei Stunden nach intraperitonealer Injektion von je 1000 USP Parathormon pro kg Körpergewicht war bei Ratten von 100 - 150 g Körpergewicht ein Aktivitätsanstieg der Nierencarboanhydrase um 15 - 20% gegenüber den Normalwerten zu beobachten, und zwar im Cytosol wie auch in der Mikrosomenfraktion.



Nierencarboanhydrase von Hähnchen

Es sollte nun geprüft werden, ob cyklisches Adenosinmonophos= phat eine Mittlerfunktion bei der Erhöhung der Carboanhydrase= aktivität nach Parathormon besitzt.

Zur Klärung dieser Frage wurden sechs spezifisch pathogenfrei= en Ratten von ca. 150 g Körpergewicht je 200 mg Dibutyryl-cy= klisches AMP [DBcAMP] intraperitoneal injiziert. [Wir arbei= teten hier mit pathogenfreien Tieren, da sich die Hormonwirkung an Ratten als geringer erwiesen hatte als bei Hühnern, und bei pathogenfreien Tieren eine wesentlich geringere Streuung der ein= zelnen Enzymwerte festgestellt wurde. Auch in den noch folgen= den Parathromonversuchen arbeiteten wir deshalb nur noch mit pathogenfreien Ratten.]

Zur Injektion verwendeten wir das Dibutyrylderivat des cAMP, da von AURBACH [1971] festgestellt worden war, daß dieses biologische Membranen vollständiger passiert als cAMP und wi= derstandsfähiger gegen die Wirkung der 3'- 5'- Nukleotid-Phos= phodiesterase ist.

[GUDER et.al. dagegen fand, daß das Dibutyrylderivat an iso= lierten Nierentubuli nicht wirksamer ist als das unsubstituierte Nukleotid.]

+ Die Tiere waren untersucht auf Enterokokken, Endokokken, Klebsiellen, Pseudomonas, etc.

Zwei Stunden nach der DBcAMP-Injektion ist im Gesamthomogenat eine 25%-ige Steigerung der Carboanhydraseaktivität gegenüber den Normalwerten nachzuweisen.

Um die Verfälschung der Enzymaktivitäten durch eventuell vorhandene Blutcarboanhydrase auszuschließen, bestimmten wir den Hämoglobingehalt des Homogenates, den Hämoglobingehalt und den Carboanhydrasegehalt der Erythrozyten. Der Quotient aus dem Hb-Gehalt des Organextraktes und dem des Blutes ergibt den prozentualen Blutgehalt des Nierenhomogenates.

Durch Bestimmung des Carboanhydrasegehaltes der Erythrocyten kann dann der Gehalt an Blutcarboanhydrase des Organextraktes bestimmt werden und von der Gesamtcarboanhydrase des Nierenhomogenates subtrahiert werden.

Da nach BERNSTEIN beim Homogenisieren nach POTTER die Erythrocyten nicht zerstört werden, sollte im 105 000 g-Überstand alle Carboanhydrase aus der Niere stammen, denn bei der Zentrifugation findet man im Sediment die Kerne, Zelltrümmer und Erythrocyten.

Wir haben trotzdem bei mehreren Versuchsreihen den Hämoglobingehalt des 105 000 g-Überstandes bestimmt und fanden immer einen minimalen Prozentsatz an Hämoglobin, so daß eine geringe Hämolyse offensichtlich doch eingetreten war. Bei den Hämoglobinbestimmungen in der Mikrosomenfraktion fand sich niemals Hämoglobin.

Allerdings waren die Korrekturen, die sich aus den Hb-Be=stimmungen ergaben relativ klein, daher wurden die Korrek=turen nicht bei allen Versuchen durchgeführt. Vor allen Din=gen änderten die Korrekturen nichts an den Aktivitätsunter=schieden der Nierencarboanhydrase zwischen Kontrolltieren und den Tieren, die Parathormon, bzw. DBcAMP erhalten hatten.

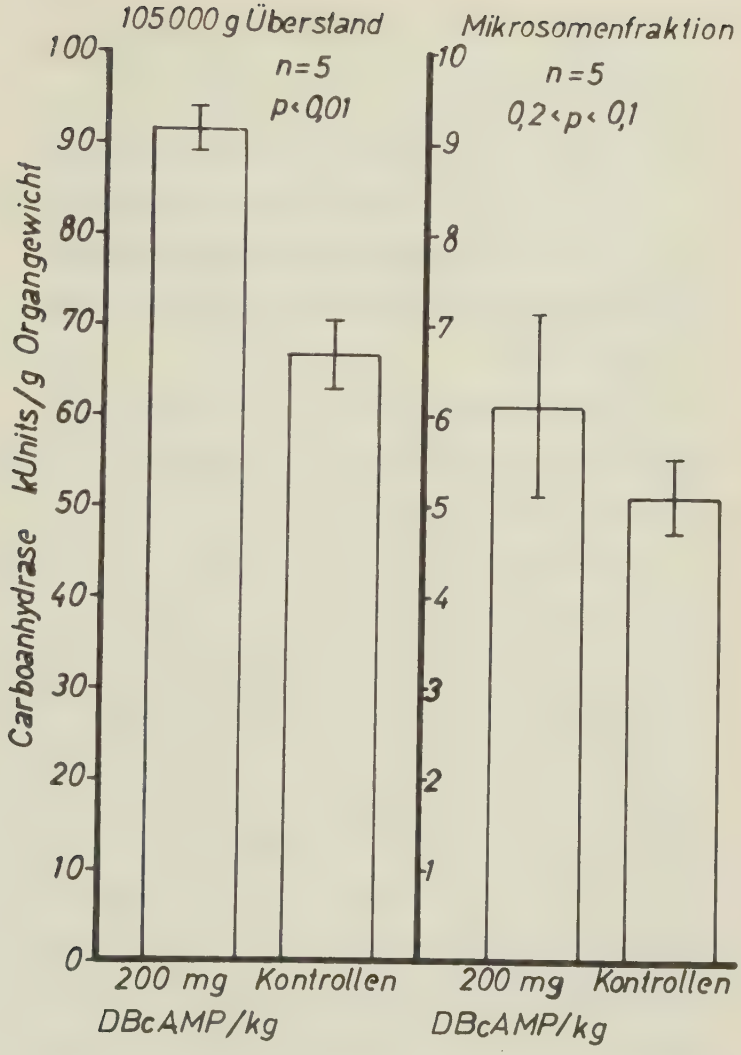
Bei der Fraktionierung der Nierenhomogenate von Tieren, die DBcAMP-Injektionen erhalten hatten, fanden wir im 105 000 g-Überstand eine 15%-ige $^{+}$Erhöhung der Carboanhydraseaktivi=tät. In der mikrosomalen Fraktion dagegen fanden wir eine geringe Verminderung der Carboanhydraseaktivität.

Einen analogen Versuch führten wir mit Hühnern durch, denen wir 200 mg DBcAMP pro kg Körpergewicht intravenös inji=zierten. Nach anderthalb Stunden war hier ebenfalls wie nach Parathormon eine Carboanhydraseaktivitätssteigerung im Cyto=sol um 35% gegenüber den Kontrollwerten zu beobachten. In der Mikrosomenfraktion war der Einfluß nicht signifikant.

[Graphische Darstellung s. nächste Seite.]

Dieses Ergebnis steht im Einklang mit den Befunden von WELLS und LLOYD, RASMUSSEN und RUSSEL, daß sowohl cyklisches Adenosinmonophosphat wie auch der Phosphodiesteraseinhibitor Theophyllin die Wirkung von Parathormon teilweise imitieren.

$^{+}$[andere Tiergruppe, daher nicht mit dem Wert von S. 21 zu vergleichen.]



Nierencarboanhydrase von Hähnchen

Da cAMP bei einigen Hormonwirkungen in eine de novo Synthese von Ezymproteinen eingeschaltet ist, behandelten wir die nächsten Versuchstiere vor der Hormoninjektion mit Actinomycin D, einem wirksamen Inhibitor der Proteinbiosynthese. Damit wollten wir klären, ob die Aktivitätsvermehrung von Carboanhydrase nach Parathormon und cyklischem Adenosinmonophosphat auf einer Neubildung des Enzyms durch Proteinbiosynthese beruht.

Je fünf pathogenfreie Ratten erhielten 1 mg Actinomycin D pro kg Körpergewicht eine Stunde vor der Parathormonapplikation intraperitoneal injiziert. Zwei Stunden nach der Parathormoninjektion wurden die Tiere getötet und die Nieren entnommen. Bei der Carboanhydraseaktivitätsbestimmung war kein Unterschied feststellbar zwischen den Werten von den Tieren, die nur Parathormon und denen, die Parathormon und Actinomycin D erhalten hatten, - und zwar weder im 105 000 g-Überstand noch in der Mikrosomenfraktion der Nierenhomogenate. Actinomycin D hebt also die Hormonwirkung bezüglich der renalen Carboanhydrase nicht auf, wohl aber die Parathormonwirkung auf die Plasma-Calcium-Werte, die nach Parathormoneinwirkung um ca 2 mg/100 ml Serum ansteigen, während wir sie jedoch bei vorheriger Actinomycin D-Gabe unverändert fanden.

[RAISZ und NIEMANN [1967] und RASMUSSEN, ARNAUD und HAWKER [1964] beobachteten diese Hemmwirkung der Parathormonwirkung auf die Plasma-Calcium-Werte nach Actinomycin D 6 Stunden nach der Actinomycin D- Injektion, während sie den anfänglichen Calciumanstieg nach Parathormon nicht beeinflußt fanden.] Wir fanden diesen hemmenden Einfluß von Actinomycin D schon drei Stunden nach der Actinomycin D - Injektion.

Tabellen und Erläuterungen zu den Versuchen

A] Parathormon

1. Carboanhydraseaktivität im 35000 g Überstand von Hühnernierenhomogenat:

Kontrollwerte	Nach 200 USP Parathormon/kg
36,2 kUnits / g Niere	78,6 kUnits / g Niere
44,1 kUnits / g Niere	86,2 kUnits / g Niere
45,3 kUnits / g Niere	59,8 kUnits / g Niere
52,9 kUnits / g Niere	54,4 kUnits / g Niere
26,8 kUnits / g Niere	65,1 kUnits / g Niere
42,1 kUnits / g Niere	52,0 kUnits / g Niere
41,2 kUnits / g Niere $\pm$ 3,6 x]	66,0 kUnits / g Niere $\pm$ 5,6

$p = 0,01$

2. Carboanhydraseaktivität in Cytosol und Mikrosomenfraktion von Hühnernierenhomogenat [andere Tiergruppe, daher 1 und 2 nicht vergleichbar.]

105 000 g - Überstand

Kontrollwerte	Nach 200 USP Parathormon/kg
84,2 kUnits / g Niere	112,4 kUnits / g Niere
68,2 kUnits / g Niere	102,9 kUnits / g Niere
90,5 kUnits / g Niere	93,6 kUnits / g Niere
64,8 kUnits / g Niere	103,0 kUnits / g Niere
65,1 kUnits / g Niere	119,6 kUnits / g Niere
72,5 kUnits / g Niere	94,3 kUnits / g Niere
74,2 kUnits / g Niere $\pm$ 4,4	104,3 kUnits / g Niere $\pm$ 4,2

$p < 0,01$

x] mittlerer Fehler des Mittelwertes

Mikrosomenfraktion

Kontrollwerte	Nach 200 USP Parathormon/kg
5,2 kUnits / g Niere	7,4 kUnits / g Niere
3,9 kUnits / g Niere	6,4 kUnits / g Niere
4,3 kUnits / g Niere	5,5 kUnits / g Niere
3,7 kUnits / g Niere	7,5 kUnits / g Niere
5,5 kUnits / g Niere	7,0 kUnits / g Niere
5,8 kUnits / g Niere	7,0 kUnits / g Niere
4,7 kUnits / g Niere $\pm$ 0,4	6,8 kUnits / g Niere $\pm$ 0,3

$p < 0,01$

3. Carboanhydraseaktivität in Cytosol und Mikrosomenfraktion von Rattennierenhomogenat:

105 000 g - Überstand

Kontrollwerte	Nach 200 USP Parathormon/kg
68,0 kUnits / g Niere	70,0 kUnits / g Niere
62,2 kUnits / g Niere	72,0 kUnits / g Niere
68,9 kUnits / g Niere	71,0 kUnits / g Niere
60,8 kUnits / g Niere	80,0 kUnits / g Niere
62,4 kUnits / g Niere	82,0 kUnits / g Niere
66,2 kUnits / g Niere	71,0 kUnits / g Niere
64,4 kUnits / g Niere	71,0 kUnits / g Niere
68,2 kUnits / g Niere	71,0 kUnits / g Niere
65,3 kUnits / g Niere $\pm$ 2,2	73,6 kUnits / g Niere $\pm$ 1,7

$0,05 > p > 0,02$

Mikrosomenfraktion

Kontrollwerte	Nach 1 000 USP Parathormon/kg
4,7 kUnits / g Niere	5,2 kUnits / g Niere
4,5 kUnits / g Niere	5,4 kUnits / g Niere
4,8 kUnits / g Niere	5,6 kUnits / g Niere
4,9 kUnits / g Niere	6,1 kUnits / g Niere
4,5 kUnits / g Niere	5,8 kUnits / g Niere
4,9 kUnits / g Niere	5,7 kUnits / g Niere
4,7 kUnits / g Niere $\pm$ 0,08	5,6 kUnits / g Niere $\pm$ 0,1

$p < 0,01$

Erläuterungen zu A 1 und 2:

Je sechs Hähnen von ca. 500 g Körpergewicht wurde 1 ml = 100 USP Parathormon intravenös injiziert.

Zur Calcium - Bestimmung wurde den Hähnen vor der Parathormon=injektion Blut entnommen, eine zweite Blutentnahme erfolgte andert=halb Stunden nach Parathormongabe.

Kurz nach der zweiten Blutentnahme wurden die Hähne durch Deka=pitation getötet und die Nieren entnommen und homogenisiert. Sechs unbehandelten Tieren wurden die Nieren entnommen, um Kontroll=werte zu erhalten.

Zu Tabelle A 3:

Die Carboanhydraseaktivitäten im Nierenhomogenat von acht patho=genfreien Ratten dienten als Kontrollwerte. Acht pathogenfreie, männliche Ratten von 100 - 150 g Körpergewicht erhielten 1 000 USP Parathormon/kg Körpergewicht intraperitoneal.

Nach zwei Stunden wurden die Tiere mit Äther narkotisiert.

Der Thorax wurde eröffnet, und durch Herzpunktion wurden ca. 1,5 ml Blut zur Calcium-Bestimmung gewonnen.

Anschließend wurden die Nieren entnommen und homogenisiert.

B] Dibutyryl-cyklisches-Adenosinmonophosphat

1. Carboanyhdraseaktivität in Cytosol und Mikrosomenfraktion von Hühnernierenhomogenat:

105 000 g-Überstand

Kontrollwerte	Nach 200 mg DBcAMP/kg
66,9 kUnits / g Niere	93,3 kUnits / g Niere
60,3 kUnits / g Niere	89,4 kUnits / g Niere
66,9 kUnits / g Niere	90,4 kUnits / g Niere
68,0 kUnits / g Niere	94,3 kUnits / g Niere
70,9 kUnits / g Niere	89,4 kUnits / g Niere
66,6 kUnits / g Niere ± 3,9	91,4 kUnits / g Niere ± 2,3

$p < 0,01$

Mikrosomen

Kontrollwerte	Nach 200 mg DBcAMP/kg
5,5 kUnits / g Niere	6,5 kUnits / g Niere
4,9 kUnits / g Niere	5,7 kUnits / g Niere
5,4 kUnits / g Niere	6,5 kUnits / g Niere
4,5 kUnits / g Niere	4,7 kUnits / g Niere
5,1 kUnits / g Niere	7,5 kUnits / g Niere
5,1 kUnits / g Niere ± 0,4	6,1 kUnits / g Niere ± 1,0

$0,2 > p > 0,1$

2. Carboanhydraseaktivität im Gesamthomogenat, Cytosol und Mikrosomenfraktion von Rattennieren:

Gesamthomogenat

Kontrollwerte	Nach 200 mg DBcAMP/kg
45,0 kUnits / g Niere	56,1 kUnits / g Niere
43,0 kUnits / g Niere	51,5 kUnits / g Niere
45,4 kUnits / g Niere	48,6 kUnits / g Niere
44,8 kUnits / g Niere	50,4 kUnits / g Niere
45,2 kUnits / g Niere	49,3 kUnits / g Niere
44,0 kUnits / g Niere	49,0 kUnits / g Niere
44,6 kUnits / g Niere $\pm$ 0,5	50,8 kUnits / g Niere $\pm$ 1,1

$p < 0,01$

105 000 g-Überstand

Kontrollwerte	Nach 200 mg DBcAMP/kg
55,4 kUnits / g Niere	61,2 kUnits / g Niere
55,4 kUnits / g Niere	63,2 kUnits / g Niere
56,5 kUnits / g Niere	62,2 kUnits / g Niere
55,7 kUnits / g Niere	61,2 kUnits / g Niere
55,7 kUnits / g Niere $\pm$ 0,4	61,9 kUnits / g Niere $\pm$ 0,5

$p < 0,01$

Mikrosomen

Kontrollwerte	Nach 200 mg DBcAMP/kg
4,6 kUnits / g Niere	3,4 kUnits / g Niere
4,7 kUnits / g Niere	3,4 kUnits / g Niere
4,2 kUnits / g Niere	3,3 kUnits / g Niere
4,5 kUnits / g Niere	3,3 kUnits / g Niere
4,5 kUnits / g Niere $\pm$ 0,1	3,4 kUnits / g Niere $\pm$ 0,03

$p < 0,01$

Zu Tabelle B 1:

Fünf junge Hähne [ca. 500 g] dienten als Kontrolltiere, fünf andere Tiere erhielten 200 mg DBcAMP [in 0,9%-iger NaCl-lösung] intravenös. Anderthalb Stunden nach der Injektion wurden die Tiere getötet und die Nieren entnommen und homogenisiert. Nach DBcAMP-Injektionen wurde kein Blut zur Calciumbestimmung entnommen, da nach WELLS und LLOYD [1969] DBcAMP an intakten Tieren keine Wirkung auf den Serum-Calcium-Spiegel hat.

Zu Tabelle B 2:

Sechs pathogenfreie, männliche Ratten dienten als Kontrolltiere, sechs andere Ratten von 100-150 g Körpergewicht erhielten 200 mg DBcAMP [in 0,9%-iger NaCl-Lösung] intraperitoneal. Nach zwei Stunden wurden die Nieren entnommen und homogenisiert.

C | Actinomycin D und Parathormon

Carboanhydraseaktivität in Cytosol und Mikrosomenfraktion von Rattennierenhomogenaten:

105 000 g-Überstand

Kontrollwerte [Parathormon]	Actinomycin D und Parathormon
73,9 kUnits / g Niere	89,4 kUnits / g Niere
84,6 kUnits / g Niere	81,7 kUnits / g Niere
84,6 kUnits / g Niere	88,5 kUnits / g Niere
84,6 kUnits / g Niere	84,6 kUnits / g Niere
82,6 kUnits / g Niere	78,7 kUnits / g Niere
82,0 kUnits / g Niere ± 2,1	84,6 kUnits / g Niere ± 2,0

Mikrosomen

Kontrollwerte [Parathormon]	Actinomycin D und Parathormon
3,8 kUnits / g Niere	5,8 kUnits / g Niere
5,9 kUnits / g Niere	5,2 kUnits / g Niere
5,0 kUnits / g Niere	4,5 kUnits / g Niere
4,9 kUnits / g Niere	6,2 kUnits / g Niere
5,9 kUnits / g Niere	5,4 kUnits / g Niere
5,1 kUnits / g Niere ± 0,4	5,4 kUnits / g Niere ± 0,4

Die Unterschiede liegen in der Fehlerbreite der Meßwerte.

Erläuterungen:

Fünf pathogenfreie Ratten erhielten 1 mg Actinomycin D/ kg intraperitoneal injiziert, nach einer Stunde wurden ihnen 1000 USP Parathormon/kg intraperitoneal appliziert. Fünf weitere Ratten erhielten nur 1000 USP Parathormon intraperi=

toneal. Jeweils zwei Stunden nach der Parathormoninjektion wurde zur Calcium-Bestimmung durch Herzpunktion Blut gewonnen. Dann wurden die Nieren entfernt und homogenisiert.

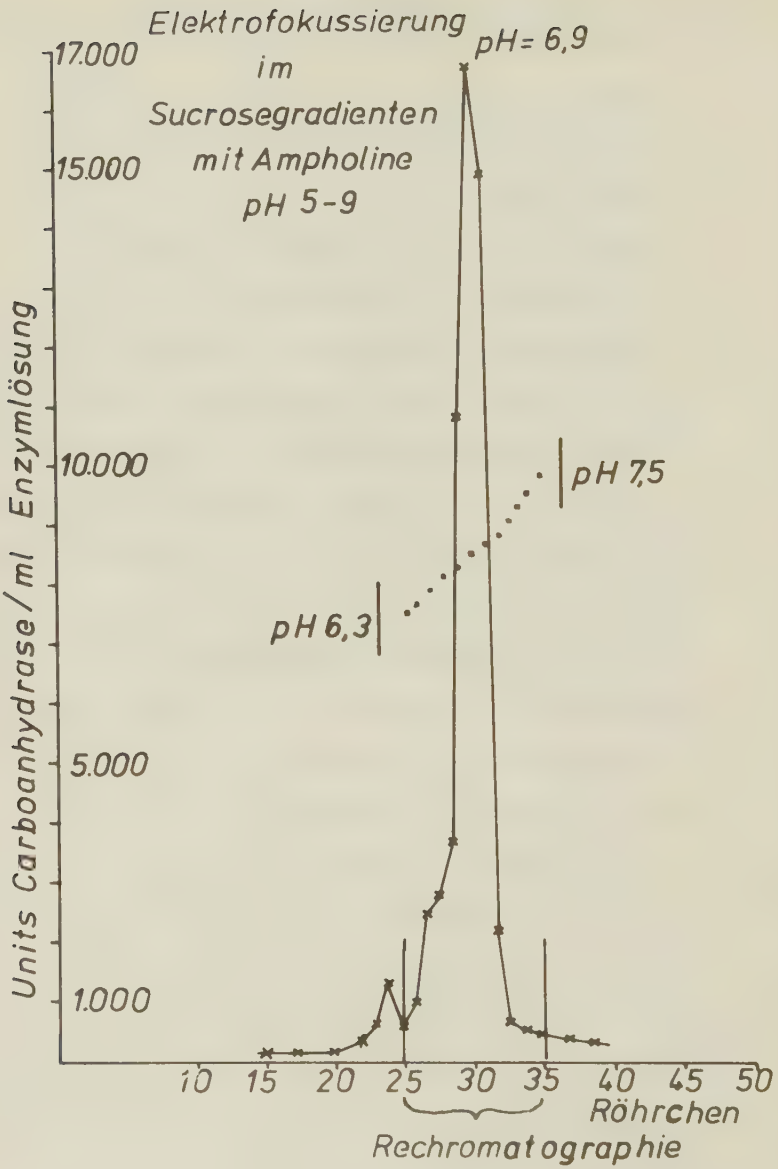
Auftrennung der Carboanhydrase im Hühnernierencytosol in ihre Isoenzyme

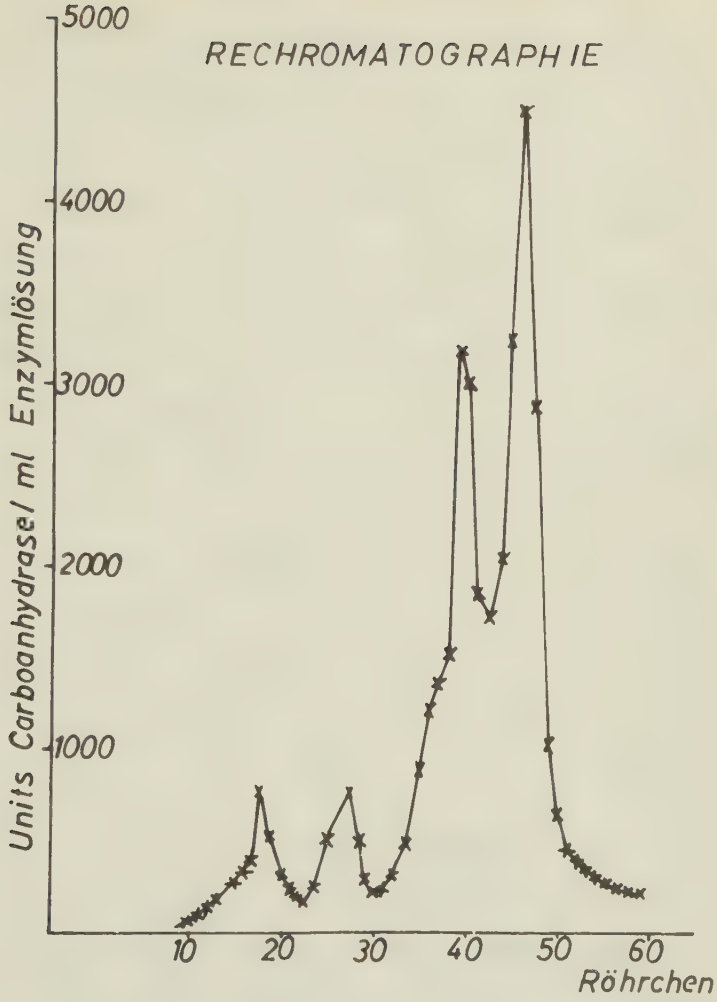
Zur weiteren Charakterisierung der Parathormonwirkung auf die Nierencarboanhydrase versuchten wir, die Carboanhydrase in Isoenzyme aufzutrennen und zwar sowohl bei Kontrolltieren als auch bei den Tieren, die Parathormon erhalten hatten. Mit Hilfe der Discelektrophorese, bzw. Elektrofokussierung in Acrylamidgelen [pH-Bereich 3 - 10] waren keine Unterschiede zu beobachten. Es war jeweils nur eine Bande zu sehen. Die Detektion der Carboanhydrase [HOLKE, SIEGMUND 1971] erfolgte mit Hilfe von 1-Dimethylamino-naphtalin-5-sulfonamid, eines Inhibitors der Carboanhydrase, der nach CHEN und KERNOHAN einen im ultravioletten Licht hellblau fluoreszierenden Komplex bildet. Bei der Elektrofokussierung im Sucrosegradienten mit Ampholine [pH-Bereich 5-9] bestimmten wir nach Auftrennung der dialysierten 105 000 g-Überstände auf der Elektrofokussiersäule die Carboanhydraseaktivitäten der einzelnen 2,5 ml Fraktionen. Dabei erhielten wir jeweils nur eine Hauptfraktion, sowohl aus den Überständen der Nierenhomogenate der Kontrolltiere, als auch aus den entsprechend behandelten Nierenhomogenaten der Tiere, die Parathormon erhalten hatten. Außer dieser Hauptfraktion war noch eine kleine Nebenbande zu erkennen, die jedoch nicht weiter untersucht wurde. Die Fraktionen, die

dieser Hauptbande entsprachen, wurden vereinigt und in der "leichten Lösung" erneut im Sucrosegradienten auf die Säule gegeben. Eine erneute Ampholine-Zugabe war nicht nötig, da dessen Konzentration beim ersten Lauf verhältnismäßig hoch gewählt worden war.

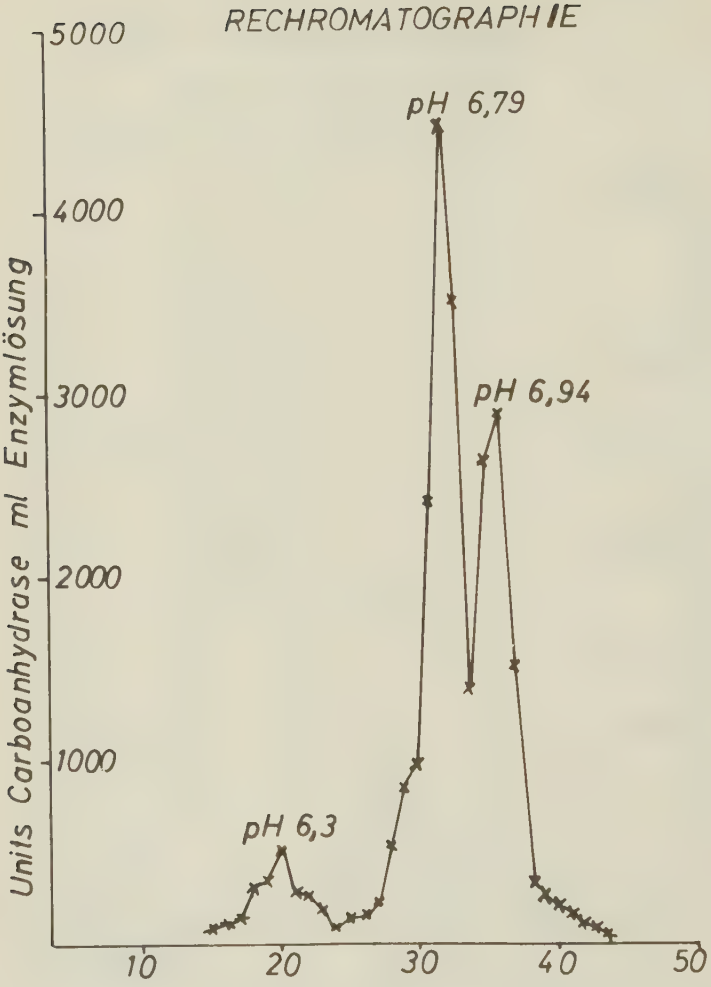
Diese Rechromatographie ergab dann eine Auftrennung in zwei nahe beieinander liegende Hauptfraktionen und zwei kleinere Nebenfraktionen. Parathormongaben kehrten das Verhältnis der Aktivitäten der beiden Hauptfraktionen in der Rechromatographie um. Bei den Kontrolltieren war die Enzymbande mit dem höheren Isoelektrischen Punkt die aktivere, bei den Tieren, die Parathormon erhalten hatten, war diejenige mit dem niedrigerem Isoelektrischen Punkt die aktivere.

Bei Rattennierenhomogenaten gelang eine entsprechende Auftrennung nicht.


Elektrofokussierung
im
Sucrosegradienten
mit Ampholine
pH 5-9
pH= 6,9
pH 7,5
pH 6,3
17.000
15.000
10.000
5.000
1.000
Units Carboanhydrase / ml Enzymlösung
10
15
20
25
30
35
40
45
50
Röhrchen
Rechromatographie



Nierencarboanhydrase von Kontrolltieren (Hähnchen)



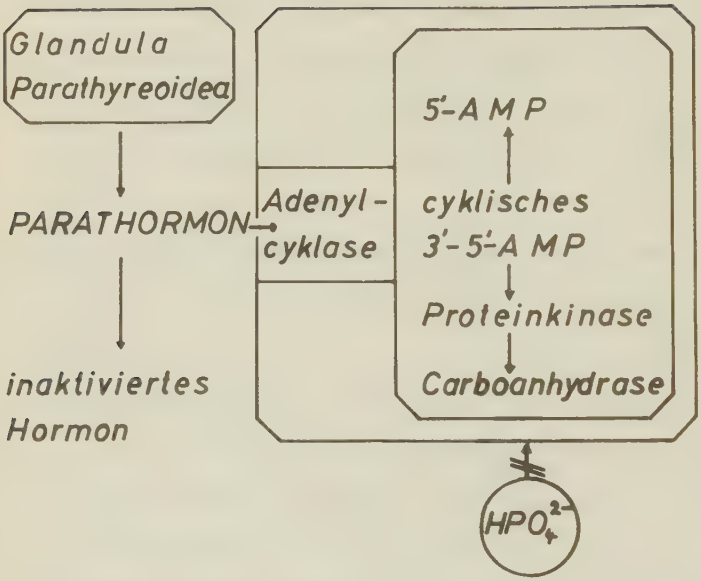
Nierencarboanhydrase von Hähnchen nach Parathormoninjektion

Diskussion

Schon 1955 fand LUTWAK-MANN, daß die Carboanhydrase auf Grund einer Hormonwirkung im Erfolgsorgan des Hormons gesteigert wird, nämlich im Uterus nach Progesterongaben.
Wir haben nun in einem Erfolgsorgan vom Parathormon, - in der Niere, - entsprechende Befunde erhalten.
Da durch Parathormon-und DBcAMP-Gaben die Carboanhydraseaktivität in der Niere beträchtlich erhöht wird, stellen sich zwei Fragen:

1. Welcher Mechanismus liegt der Aktivierung der Carboanhydrase zu Grunde, bzw. welche Reaktionsfolge liegt hier vor?
2. Gibt es einen Zusammenhang zwischen der erhöhten Carboanhydraseaktivität und der Hemmung der PO_4 -Rückresorption durch Parathormon? Denn der physiologische Erfolg von Parathormon in der Niere ist eine gesteigerte Phosphatdiurese auf Grund der Rückresorptionshemmung.

Als Parathormonwirkung an der Niere ist weiterhin gesichert, daß eine membrangebundene Adenyl Cyklase aktiviert wird [CHASE und AURBACH 1969/70], und daß es zu einer erhöhten Konzentration von cyklischem Adenosinmonophosphat sowohl in der Zelle wie im Harn kommt [CHASE und AURBACH 1967]. Aus diesen Befunden könnte man analog dem allgemeinen Schema für Hormonwirkungen von SUTHERLAND für die Parathormonwirkung auf die Carboanhydrase folgende Reaktionsfolge annehmen:



Parathormon aktiviert die membrangebundene Adenyl-Cyklase, der intrazelluläre Spiegel des cyklischen Adenosinmonophosphat wird erhöht. Wie bei wohl allen cAMP-Wirkungen wird mindestens eine Proteinkinase aktiviert, die den γ-PO_4 -Rest vom ATP auf ein Enzymprotein überträgt. Dieses Enzymprotein könnte hier die Carboanhydrase bzw. eine weniger aktive Vorstufe sein.

Hierfür sprechen die Ergebnisse unserer Elektrofokussierung: Wir haben hier aus den 105 000 g-Überständen von Hühnernierenhomogenaten zwei Hauptbanden der Carboanhydrase er-

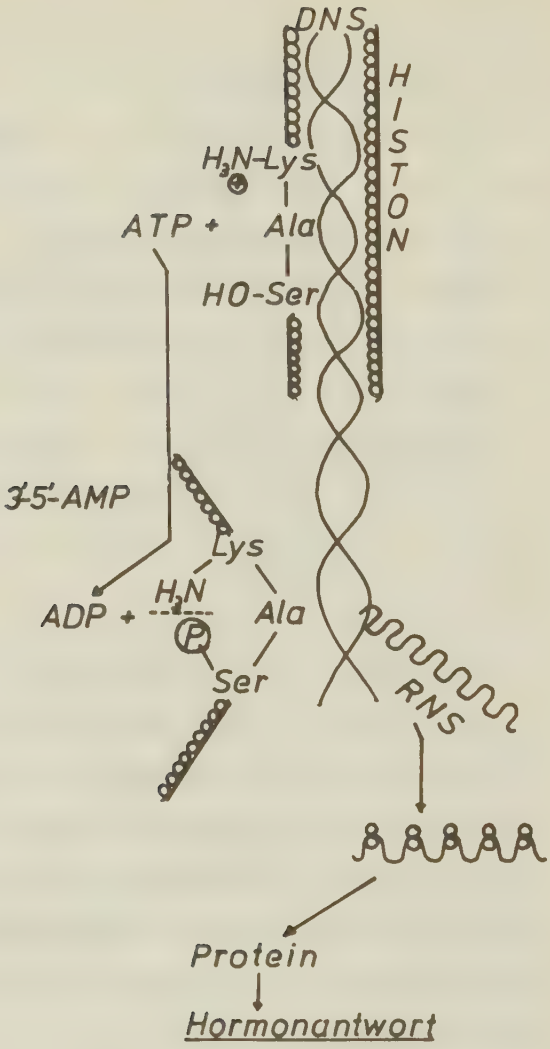
halten, deren Aktivitätsverhältnis [Bandenhöhe] nach Parat= hormon umgekehrt war. Diese Isoenzymbanden liegen auf Grund eines sehr kleinen Unterschiedes ihrer Isoelektrischen Punkte dicht beieinander. Dies steht mit der Annahme im Ein= klang, daß der einzige stoffliche Unterschied der beiden Iso= enzyme in einer Phosphatgruppe besteht.

Cyklisches AMP kann andererseits auch ein "Mediator" für Hormone sein, die eine Proteinneusynthese bewirken.

[Glukagon z.B. bewirkt in Dosen, bei denen eine Histonphos= phorylierung nachweisbar war, eine Actinomycin D empfindli= che Neusynthese der Leber-Tyrosin-Transaminase [HOLTEN, KENNEY 1967] und der Serin-Dehydratase [JOST, KHAIRAL= LAH, PITOT 1968]].

Cyklisches AMP wirkt hier vermutlich über die Phosphorylie= rung von Histonen, die damit als Repressoren der Gentrans= skription inaktiviert werden. [Zeichnung s. nächste Seite]

Da aber Actinomycin D, der Inhibitor der Proteinsynthese, kei= nen Einfluß auf die Steigerung der Carboanhydraseaktivität nach Parathormon hat, ist dieser Weg hier wohl auszuschließen. Es liegt also keine Neusynthese von Carboanhydrase vor, sondern wahrscheinlich eine Aktivierung einer inaktiven oder weniger aktiven Vorstufe.



Schema für die horm. induz. RNS- und Protein-synthese (LANGAN 1970).

Anders ist der Mechanismus bei der Erhöhung der Carboanhydraseaktivität in der Rattenniere nach Aldosteron. Hier fanden SUZUKI und OGAWA [1970], daß sich die Aktivitätssteigerung durch Actinomycin D - Gaben unterdrücken ließ.

Wir überprüften diesen Befund und bestimmten gleichzeitig das cAMP[+] in Nierenhomogenaten nach Aldosterongabe. Es fand sich keine Erhöhung der cAMP-Konzentration, während wir die Steigerung der Carboanhydraseaktivität bestätigt fanden.

Das Aldosteron scheint also direkt bei der Proteinbiosynthese einzugreifen, ohne Vermittlung von cAMP, eine Hypothese, die von vielen Autoren [z.B. SCHULTZ 1972] für die Wirkungen von Steroiden diskutiert wird.

Welcher Zusammenhang besteht nun zwischen der Carboanhydraseaktivierung und der Steigerung der PO_4- Ausscheidung nach Parathormon?

Die Carboanhydrase ist nicht in der Zellmembran lokalisiert, - auch die mikrosomale Carboanhydrase kann nicht aus der Membran stammen, da die Membranfragmente schon viel früher als die Mikrosomen sedimentieren. Daher ist ein für Vasopressin vorgeschlagener Mechanismus, nämlich eine cAMP-abhängige reversible Phosphorylierung eines Plasma-Membran-Proteins [DOUSA, SANDS, HECHTER 1972] im Zusammenhang mit der Carboanhydrase nicht zu diskutieren.

[+]Ich danke Herrn Dr. Wombacher für die Bestimmung des cAMP nach WOMBACHER, KÖRBER 1972.

Wie schon in der Einleitung diskutiert worden ist, kommen hohe Carboanhydraseaktivitäten vor allem in solchen Zellen vor, bei denen ein intensiver Ionenaustausch stattfindet. In den Zellen des proximalen Tubulus besteht dieser Ionentransport in der von Parathormon gesteuerten PO_4 - Rückresorption. Der Sinn der Carboanhydraseaktivierung durch Parathormon könnte in der Notwendigkeit einer sehr schnellen HCO_3^--Ionenbildung bestehen, um die durch mangelnde PO_4-Rückresorption hervorgerufene Störung des Ionenmilieus zu kompensieren.

Möglicherweise erleiden auch die sonst PO_4 - rückresorbierenden Zellen pH-Veränderungen beim Ausbleiben der Phosphatresorption [HPO_4^- oder H_2PO^-]. Dann ist hier wie in anderen Zellen die schnelle Einstellung des Gleichgewichts $CO_2 + H_2O \rightleftharpoons H^+ + HCO_3^-$ erforderlich, um diese zu kompensieren.

Aus dem Befund von KENNY et. al. [1969], daß Azetazolamid die Calcium-Ausscheidung in der Niere hemmt, kann man schließen, daß die Carboanhydrase auch bei der Regulation der Calcium-Ausscheidung beteiligt ist. Auch hier könnte die schnelle Nachbildung von H^+-Ionen zu Kompensationszwekken erforderlich sein. [Vgl. S.12 , die Bedeutung der Carboanhydrase bei der Na-Ausscheidung [PITTS und ALEXANDER].

Carboanhydrase katalysiert außer der CO_2-Hydratation auch die Hydrolyse verschiedener Ester [TASHIAN und DOUGLAS 1964] und die Hydratation von Aldehyden [KERNOHAN 1965]. Aber diese Reaktionen lassen keinen Zusammenhang mit der PO_4 - Diurese erkennen.

Aussagen über die wirkliche Aufgabe der durch Parathormon in der Niere aktivierten Carboanhydrase bleiben daher vorläufig Spekulationen.

Eine andere Wirkung des Parathormons an den Nierenzellen ist die Steigerung der Glukoneogenese aus L- Lactat, Pyruvat, Glutamat und Glycerin [GUDER und WIELAND 1972]. Gleichzeitig wurde eine erhöhte Substrataufnahme nach Parathormon gefunden. Auch hier werden die Hormonwirkungen durch cyklisches AMP imitiert. Die physiologische Bedeutung dieses Befundes ist noch ungeklärt.

Die Konzentration von cAMP in den Nierenzellen wird auch von anderen Hormonen beeinflußt: nämlich von Calcitonin, Adrenalin [MELSON et.al. 1970] und Vasopressin [ORLOFF et.al. 1962]. Calcitonin wirkt hier wohl gleichsinnig wie Parathormon, da beide Hormone die PO_4 -Diurese fördern [GEKLE und KURTH 1968]. Vasopressin fördert die Rückresorption von Wasser in den Zellen des Nierenmarks. Wir untersuchten auch seinen Einfluß auf die Carboanhydraseaktivität, erhielten aber keine Aktivitätsveränderungen.

Es ist anzunehmen, daß Parathormon und Vasopressin die cAMP - Konzentration in verschiedenen Arten von Nieren= zellen erhöhen, und daher auch unterschiedliche Proteine der Phosphorylierung unterliegen. Hierfür spricht auch die unterschiedliche Wirkung von Parathormon und Vasopressin auf den cAMP - Gehalt der Zellen von Nierenrinde und Nie= renmark [SCHULTZ 1971].

Materialien

Die Hühner waren im Tierhandel gekauft oder teilweise aus eigener Zucht.

Spezifisch pathogenfreie Ratten kauften wir bei der Süddeutschen Versuchstierfarm, H.Voss K.G., Tuttlingen.

Parathormon in Ampullen kauften wir bei Firma E. Lilly, Gießen, eine größere Menge eines Trockenpräparates war ein Geschenk der Firma E.Lilly, Indianapolis, USA.*

DBcAMP war ein Handelspräparat der Firma Boehringer,Mannheim.

Actinomycin D kauften wir bei Firma Serva,

Aldosteron war von Firma Merck,

Vasopressin war von Koch-Light Laboratories LTD, Colnbrock-Bucks.

Reagenzien für die Gelelektrophorese und Gelelektrofokussierung waren analysenreine Handelspräparate der Firma Serva, Heidelbg.

Ebenfalls von Firma Serva war das 1-Dimethylamino-naphtalin-5-sulfochlorid, aus dem durch Zusammengeben von 250 mg in 2 ml Aceton mit 1 ml 33%-iger Ammoniaklösung das Sulfonamid hergestellt wurde. Nach Umkristallisieren aus Alkohol zeigte es den Schmelzpunkt bis 215° C. [WEBER 1952]

Ampholine kauften wir bei LKB, Bromma, Schweden.

Die anderen verwendeten Substanzen waren analysenreine Handelspräparate.

* Wir danken der Firma E. Lilly, Indianapolis, USA, für die Überlassung von Parathormon als Trockensubstanz.

Apparate

Photometer Eppendorf,

Säulenelektrophoresegerät der Firma Shandon, London,

Elektrofokussiersäulen nach H. HAGLUND [Methods of Biochemical Analysis Vol. 19],

LKB Uniphor Säulen-Elektrophorese-System,

Fraktionssammler Linear II von Firma Serva.

UV-Monitor ebenfalls von Firma Serva,

Beckmann Ultrazentrifuge Spinco L 50

Ultraschalldysintegrator der Firma MSE,

LKB-Varioperpex Peristaltic Pump,

Serva Visking-Dialysierschläuche.

Tischrechner, Diehl Combitron S.

Methoden

Wir bestimmten in den Nieren von ca. 500 g schweren Hähnen

a] ohne jede Vorbehandlung,

b] nach Parathormoninjektion,

c] nach parenteraler Gabe von DBcAMP

die Carboanhydraseaktivität.

Entsprechende Untersuchungen wurden an Ratten durchgeführt:

a] ohne Vorbehandlung,

b] nach Parathormoninjektion,

c] nach DBcAMP-Injektion

d] nach Actinomycin D-Gabe und nachfolgender Parathormon injektion.

Bei den Hähnen wurden sämtliche Injektionen intravenös durchgeführt, bei Ratten intraperitoneal.

Um den Unterschied in der Applikationsmethode in etwa auszugleichen, wurde mit der Tötung der Tiere und der anschließenden Nierenpräparation bei Ratten eine halbe Stunde länger gewartet als bei analogen Versuchen mit Hähnen.

Außerdem wurde den Ratten im Vergleich zu den Hähnen die fünffache Dosis Parathormon appliziert.

Nach Tötung der Tiere und Entnahme der Nieren wurden die den Nieren anhaftenden Blutkoagula und das Fettgewebe entfernt.

Dann wurden die Nieren mit der doppelten Menge [2 ml/gNiere] einer 0,5 M Sucroselösung, die 0,02 M Tris [pH 7,3] und 3 mM $MgCl_2$ enthielt, im Potter unter Eiskühlung homogenisiert. Die weitere Aufbereitung erfolgte modofiziert nach der Fraktionierung von HOGEBOOM, SCHNEIDER, PALADE [1947].

Die Nierenhomogenate wurden in der Kühlzentrifuge 10 Minuten lang mit 9 000 g zentrifugiert, um die Kern- und Mitochondrienfraktion zu sedimentieren. Der Überstand wurde abpipettiert und, da sich im Sediment meist noch mitgerissene Mikrosomen befinden, dieses noch einmal im gleichen Volumen der Sucroselösung resuspendiert. Nach abermaliger Zentrifugation 10 Minuten lang bei 9 000 g wurde wiederum der Überstand abgehoben.

Das Sediment wurde verworfen, beide Überstände wurden zusammengegeben zur weiteren Zentrifugation unter Kühlung mit 105 000 g während 100 Minuten.

Der jetzt erhaltene Überstand ist das verdünnte Cytosol der Nierenzellen ohne Kerne und Mitochondrien. Das Sediment wird als Mikrosomenfraktion bezeichnet. Die Mikrosomen wurden im gleichen Volumen des Überstandes in der Sucrose-Tris-$MgCl_2$-Lösung gelöst und anschließend anderthalb Minuten mit Ultraschall behandelt, damit die Carboanhydrase der Mikrosomen in Lösung geht.

[WISTRAND und RAO behandelten die Gesamthomogenate von Rat-

tennieren mit Tween 80 und fanden mit Tween 80 eine höhere Carboanhydraseaktivität im Gesamthomogenat als vorher. Tween 80 wurde zugesetzt, um die Partikel - gebundene Carboanhydrase in Lösung zu bringen. [Nach KARLER und WOODBURG sind nur etwa 80% der Carboanhydrase im löslichen Teil des Homogenates zu finden. Ähnliche Werte gibt MAREN an.]

Wir versuchten ebenfalls, die mikrosomale Carboanhydrase mit Hilfe von Tween 80 in Lösung zu bringen. Tween 80 störte aber unseren Enzymtest. Die Carboanhydraseaktivität der Mikrosomenfraktion ließ sich aber nach Behandlung mit Ultraschall einwandfrei bestimmen.

Nach dieser Fraktionierung der Nierenhomogenate wurde in allen erhaltenen Fraktionen die Carboanhydraseaktivität bestimmt.

Die Bestimmung der Carboanhydraseaktivität.

Die Carboanhydrase wurde nach der chronometrischen Methode von ROUGHTON und BOOTH [1946] modifiziert nach WILBUR und ANDERSON [1948] durchgeführt.

Die Reaktion $H_2O + CO_2 \rightleftharpoons H_2CO_3$, die durch die Carbo= anhydrase beschleunigt wird, verläuft bei Körpertemperatur und auch schon bei Raumtemperatur ziemlich rasch. Deshalb wird zur Verringerung der Reaktionsgechwindigkeit die Messung bei 0^{o} C durchgeführt.

In einer wässrigen Lösung, die CO_2 enthält, laufen folgende vier verschiedene Reaktionen ab, von denen nur die erste durch die Carboanhydrase beschleunigt wird:

1.] $CO_2 + H_2O \rightleftharpoons H_2CO_3$

2.] $CO_2 + OH^- \rightleftharpoons HCO_3^-$

3.] $H_2CO_3 \rightleftharpoons H^+ + HCO_3^-$

4.] $HCO_3^- \rightleftharpoons H^+ + CO_3^{--}$

Unterhalb von pH 8,2 können die Reaktionen 2 und 4 vernach= lässigt werden.

Die 3. Reaktion verläuft mit so großer Geschwindigkeit, daß ihre drei Komponenten sich praktisch im Gleichgewicht befinden. Somit wird die Gesamtgeschwindigkeit der H^+- Entstehung nur durch die Reaktion $CO_2 + H_2O \rightleftharpoons H_2CO_3$ bestimmt. Daher kann die Carboanhydraseaktivität durch Messung des zeitlichen Verlaufs der Wasserstoffionenbildung bestimmt werden.

Einem schwach alkalischen Veronalpuffer, der als Indikator Brom= thymolblau enthält, wird eine bei 0^{o} C gesättigte CO_2- Lösung in Wasser zugesetzt. Nach Bildung einer bestimmten Menge von Wasserstoffionen ist die Pufferkapazität des Veronalpuffers er= schöpft, und der Indikator schlägt von blau nach grün um. Die Zeit von der Zugabe des mit CO_2 gesättigten Wassers bis zum Umschlag des Indikators von blau nach grün wird mit der Stopp= uhr gemessen. In Gegenwart von Carboanhydrase erfolgt dieser Farbumschlag wesentlich schneller. Die Enzymaktivität ist dem Quotienten aus der Differenz der Reaktionszeiten der unkataly= sierten Reaktion und der katalysierten Reaktion, dividiert durch die Reaktionszeit der katalysierten Reaktion, proportional.

$$\text{Carboanhydraseaktivität} \approx \frac{t_o - t_x}{t_x}$$

t_o = Zeit für die unkatalysierte Reaktion bei 0^{o} C.

t_x = Zeit für die durch Carboanhydrase katalysierte Reaktion.

Eine Enzymeinheit nach MELDROUM und ROUGHTON [1933], VAN GORR [1940] und ROUGHTON und BOOTH [1946] ist definiert als diejenige Enzymmenge, unter deren Einfluß die Reaktion im Versuchsansatz doppelt so schnell verläuft wie in dessen Abwesenheit.

Nach dem Report of the Commissions on Enzymes [1961] wird die Enzymeinheit als diejenige Menge eines Enzyms definiert, die bei Substratsättigung, 25^{o} C und pH - Optimum 1 μMol Substrat pro Minute umsetzt.

Diese Bedingungen sind bei der Carboanhydrase nur mit gro= ßem experimentellen Aufwand zu erreichen. Um aber den in= ternationalen Einheiten vergleichbare Einheiten zu schaffen, haben wir als Enzymeinheit diejenige Menge an Carboanhydra= se definiert, die unter unseren Versuchsbedingungen 1 µMol CO_2 pro Minute hydratisiert.

Um die "Meldroum-Roughton"-Einheiten in diese Einheiten um= zurechnen, waren folgende Überlegungen notwendig:

Bei 0^{o} C beträgt die Geschwindigkeitskonstante k_u der unkata= lysierten Reaktion der Hydratation von Kohlendioxyd 0,135 $min.^{-1}$

In bei 0^{o} C mit Kohlendioxydgas von 1 atm Druck im Gleichge= wicht stehendem Wasser sind 71 µMol CO_2/ml gelöst [WAY= GOOD 1955]. Beim Enzymtest wird die Kohlendioxydlösung 2 : 5 verdünnt, daher beträgt die Anfangskonzentration des Kohlen= dioxyds 28,4 µMol/ml. Die Pufferkapazität ist im Versuchs= ansatz 9 µMol/ml. Die CO_2-Endkonzentration entspricht dann der Differenz und beträgt 19,4 µMol/ml. Daraus ergibt sich für den Reaktionsverlauf eine mittlere Kohlendioxydkonzentration von 23,9 µMol/ml. Danach beträgt die Geschwindigkeit der unkata= lysierten Reaktion 0,135 · 23,9 = 3,23 µMol/ml und min.

Wird die Geschwindigkeit durch einen Enzymzusatz verdoppelt, dann werden enzymatisch ebenfalls 3,23 µMol/ml und min. hy= dratisiert, d.h.,daß in 1 ml des Versuchsanastzes 3,23 Einhei=

ten und damit in den 5 ml des Gesamtansatzes 16,2 Einheiten enthalten sind.

Multipliziert man die Werte, die bei der Berechnung der Enzymeinheiten nach MELDROUM und ROUGHTON erhalten werden, mit 16,2, ergeben sich die oben definierten Einheiten.

Versuchsbeschreibung:

Um die Zeit für die unkatalysierte Reaktion [t_o] zu bestimmen, werden 2,0 ml des Veronalpuffers und 1 ml Aqua bidest. in ein weites Reagenzglas [Ø = 23 mm] pipettiert. Nach Zugabe von 2,0 ml der bei 0^o C gesättigten CO_2-Lösung wird gemischt, die Stoppuhr in Gang gesetzt und die Zeit gemessen, in der das Reaktionsgemisch die Farbe des Vergleichspuffers angenommen hat. [Der Vergleichspuffer hat einen pH-Wert von 6,3].

Zur Carboanhydrasebestimmung wird genauso verfahren, nur daß die zu untersuchende Enzymlösung vorher zugesetzt wird. Das Volumen des zugeszten Aqua bidest. wird entsprechend vermindert. [Die zugesetzte Enzymmenge ist so zu bemessen, daß die Reaktionszeiten etwa zwischen 10 und 20 sec. liegen.]

Reagentien:

Veronalpuffer pH 8,15: 453 mg Veronal Natrium, 129 mg Veronal, und 5 mg Bromthymolblau werden in Wasser gelöst und im Meßkolben auf 100 ml aufgefüllt. [Gesamt-Veronal-Konzentration 0,022 M].

Vergleichslösung: 2,0 ml der Pufferlösung werden mit 3,0 ml Wasser vermischt und mit HCl an der Glas= elektrode auf den pH-Wert 6,3 eingestellt.

Gesättigte CO_2-Lsg.: bidestilliertes Wasser von 0^{o} C [im Eisbad] wird für 30 Minuten mit CO_2 durchperlt. Während der Versuchsdauer wird das Wasser weiterhin durchströmt.

Als Apparatur ist ein Eisbad erforderlich, ein Meßzylinder mit Einleitungsrohr zur Bereitung der CO_2-Lösung, Reagenzgläser, Pipetten und eine Stoppuhr.

Berechnungsbeispiel für die Errechnung der Carboanhydraseein= heiten:

	gestoppte Zeit in Sekunden
Leerwert:	180,0
Enzymwert:	15,5

$$\frac{t_o - t_x}{t_x} = \frac{180 - 15,5}{15,5} = 10,61 \text{ "Meldroum-Roughton"-Einheiten}$$

oder: $10,61 \cdot 16,2 = 171,882$ U

Meistens betrug das Volumen der zugesetzten Probe 10 μl, und bei der Bereitung der Proben wurde aus 1 g Organ 6 ml Probe= lösung erhalten. Um die entsprechenden Einheiten in 1 g Niere zu erhalten, sind die Werte mit 600 zu multiplizieren.

$171,882 \cdot 600 = 103139,2$ Units/g Niere oder 103,1 kUnits/g Niere.

Ermittlung der durch Blutreste bedingten Carboanhydraseaktivität

Nach BERNSTEIN ist eine Korrektur der Carboanhydrase-Werte wegen des Carboanhydrasegehaltes von Erythrocyten nicht notwendig, da bei der Homogenisierung im Potter die Erythrocyten nicht zerstört werden, so daß die in ihnen vorhandene Carboanhydraseaktivität bei der Enzymbestimmung im Nierenhomogenat und dessen Überstand nicht in Erscheinung tritt.

Trotzdem haben wir, sofern es technisch möglich war, genügend Blut für alle zur Blutkorrektur notwendigen Bestimmungen zu erhalten, diese durchgeführt. Nach der Blutkorrektur wiesen die Enzymwerte meist eine geringere Streuung auf.

Der Blutgehalt der untersuchten Proben wurde durch die Hämoglobinbestimmung nach HOLZER, SEDLMAYER und KIESE [1956] ermittelt.

Zu den Proben wird Ferricyanid zugesetzt und dadurch das in den Proben enthaltene Hämoglobin zu Hämiglobin umgewandelt. Durch weiteren KCN-Zusatz erfolgt die Umformung in die Cyanid-Verbindung des Hämiglobins. Bei einer Wellenlänge von 546 nm verursacht der Cyanidzusatz im Photometer eine Absorptionszunahme. Das Differenzspektrum von Hämiglobin und dessen Cyanid-Verbindung hat bei dieser Wellenlänge ein Maximum.

Der Blutgehalt von Organproben kann deshalb durch Vergleich der so erhaltenen Extinktionsdifferenzen der Organproben mit denen von bekannten Blutverdünnungen bestimmt werden.

Reagenzien:

0,125%-ige NaCl-Lösung,

0,2 M Triäthanolamin-Puffer pH 7,5

[1,856g Triäthanolamin-HCl werden in Wasser gelöst, 7,0 ml 0,5 N NaOH zugesetzt und im Meßkolben auf 50 ml aufgefüllt].

10%-iges Kaliumferricyanid,

1,0 M KCN-Lösung.

Gemessen wird im Eppendorf-Photometer mit einem Hg-Filter von 546 nm.

Versuchsbeschreibung:

500 µl mit Aqua bidest. 1 : 9 verdünntes Hämolysat wird in einer 1 cm OS-Küvette mit 1,5 ml NaCl-Lösung, 0,5 ml Triäthanolamin-Puffer und 10 µl Kaliumferricyanid zusammengegeben. Nach 5-minütigem Stehen wird die Extinktion gemessen. Dann werden 10 µl KCN-Lösung zugesetzt, gemischt, und es wird erneut die Extinktion gemessen.

Für die Überstände der Nierenhomogenate wird das gleiche Verfahren angewandt.

Anschließend werden die Carboanhydraseaktivitäten der Blutverdünnung gemessen. Für die Blutverdünnung wurden dann die Carboanhydraseeinheiten pro mg Hb berechnet. Unter Verwendung dieses Quotienten und des ermittelten Hb-Gehaltes der Zentrifugate wurde die durch Erythrocyten bedingte Carboanhydraseaktivität berechnet und von der Gesamtaktivität subtrahiert.

Serum-Calcium-Bestimmung

Zur Kontrolle der Parathormonwirkung bestimmten wir jeweils den Serum-Calcium-Gehalt der Tiere vor und nach der Parathormoninjektion.

Prinzip der Calcium-Bestimmung [SIEGMUND, DULCE 1960].

Calcium verbindet sich mit Murexid zu einem violetten Komplex. Durch Titration mit 2,5 mM EDTA, welches auf Grund der Chelatbildung ein stärkerer Komplexbildner für Calcium ist, werden dem Calcium-Murexid-Komplex die Calciumionen wieder entzogen. In dem Maße wie Calcium an EDTA gebunden wird, ändert sich die Farbe der Lösung von rot nach violett.

Im Photometer läßt sich bei schrittweiser Zugabe von EDTA zu dem Calcium-Murexid-Komplex die Spaltung desselben und die Bildung des 1 : 1 Komplexes von Calcium-EDTA an der Extinktionsabnahme erkennen. Wenn alles Calcium an EDTA gebunden vorliegt, verändert sich die Extinktion nur noch durch die Verdünnung. Der Umschlagspunkt wird graphisch ermittelt.

Aus dem Verbrauch von EDTA bis zu diesem Umschlagspunkt kann man den Calciumgehalt der untersuchten Probe bestimmen.

Reagenzien:

2 N NaOH, 2,5 mM EDTA-Lösung, Murexid 0,3 g/l, 2,5 mM $CaCl_2$-Lösung.

Versuchsbeschreibung:

Zur Bestimmung des Calciumgehaltes der Reagenzienleerwerte wird zunächst wie folgt verfahren:

In eine 4 cm OS-Küvette werden 9,5 ml bidestilliertes Wasser,+ 0,3 ml Murexid-Lösung und 100 µl $CaCl_2$ gegeben. EDTA-Lösung wird in 20 µl-Schritten aus einer Mikroliterbürette hinzugefügt. Nach gründlichem Mischen wird jedes Mal die Extinktion gemessen bis diese nicht mehr weiter abfällt.

Es werden noch zweimal je 100 µl $CaCl_2$-Lösung hinzugefügt und wie oben titriert.

Der EDTA-Verbrauch bis zum ersten Umschlagspunkt entspricht dem Calcium-Gehalt der 100 µl $CaCl_2$-Lösung und der Reagenzien, der Verbrauch zwischen dem ersten und zweiten, bzw. zweiten und dritten Umschlagspunkt entspricht nur dem Calcium-Gehalt der zugesetzten 100 µl Eichlösung.

Den Reagenzienleerwert erhält man daher, indem vom ersten Wert der Mittelwert aus dem zweiten und dritten Wert abgezogen wird.

Dieser sog. Leerwert wird dann jeweils von den für das Serum erhaltenen Werten subtrahiert.

Zur Calcium-Bestimmung im Serum wird wie oben verfahren, nur daß statt der 100 µl $CaCl_2$-Lösung 100 µl Serum eingesetzt werden.

+ 2 ml 2 N NaOH,

Elektrofokussierung

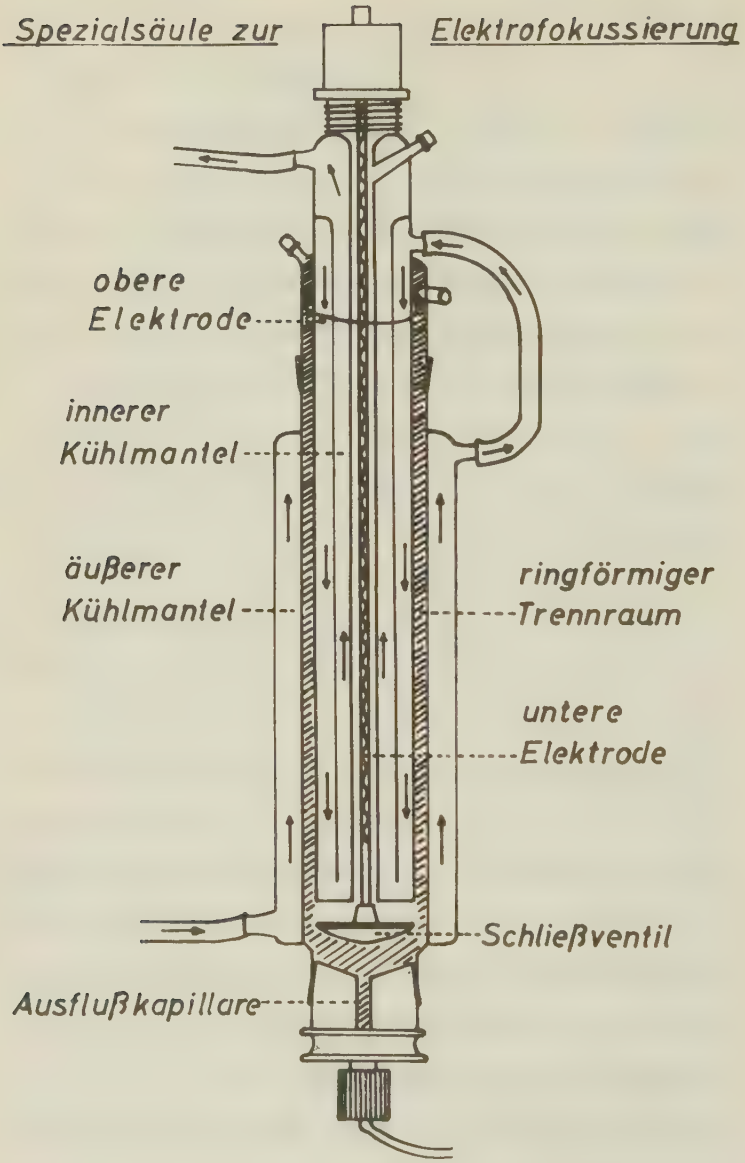
Die Elektrofokussierung ist ein neues Verfahren [HAGLUND] für die Trennung, Reinigung und Bestimmung von Proteinen und anderen Ampholyten mit hohem Molekulargewicht nach ihrem Isoelektrischen Punkt.

Wenn Trägerampholyten [Mischungen einer großen Anzahl von verschiedenen aliphatischen Polyamino - Polycarbonsäuren, deren Isoelektrische Punkte einen bestimmten pH-Bereich nahezu lückenlos ausfüllen], mit niedrigem Molekulargewicht in einem konvektionsfreien Medium einer elektrischen Spannung ausgesetzt werden, ordnen sie sich in der Reihenfolge ihrer Isoelektrischen Punkte an, und es bildet sich so ein pH-Gradient. Ampholyte mit hohem Molekulargewicht, z.B. Proteine, konzentrieren sich unter diesen Bedingungen in dem Bereich, der ihren Isoelektrischen Punkten entspricht, in schmalen Banden.

Zur Elektrofokussierung benutzten wir Glassäulen nach HAGLUND. [Zeichnung s. nächste Seite]. In dieser Säule wurde ein Sucrosedichtegradient, in dem Ampholine Trägerampholyte aufgelöst wurden, mit Hilfe zweier Schlauchpumpen und eines Mischgefäßes erstellt. Dieser Gradient wurde auf die schwere Anodenflüssigkeit geschichtet, über den Gradienten wurde die leichte Kathodenlösung gepumpt.

Die Enzymlösung wurde bei der Gradientenherstellung zur leich-

Spezialsäule zur Elektrofokussierung



ten Lösung gegeben. Wir setzten - abhängig vom Säulenvolumen- 1 - 3 ml des dialysierten 105 000 g Überstandes des Nierenhomo= genates ein. Nach Anlegen einer Gleichspannung von anfangs 200 Volt, die im Maße der Verringerung der Stromstärke all= mählich bis auf 1200 Volt erhöht wurde, bildete sich der pH-Gradient aus. Die Stromstärke betrug nie mehr als 3 mA.
Die Säule wurde während des Betriebes auf 0-4^{O} C gekühlt.
Nach Beendigung der Trennung nach ungefähr 72 Stunden wurde die Säule vom unteren Ende her durch eine Kapillare entleert. Eine Vermischung der getrennten Substanzen wird auch hier durch den stabilisierenden Enfluß des Dichtegradienten verhin= dert.
Die Kapazität einer solchen Säule beträgt etwa 80 ml, und etwa 5-10 mg Protein pro Bande können aufgegeben werden, ohne daß die Trennung unscharf wird.
Die Entleerung der Säulen erfolgte in einen Fraktionssammler, angeschlossen war des weiteren ein UV-Monitor, durch den die Absorption bei 254 nm registriert wurde.
Die Fraktionen hatten ein Volumen von je 2,5 ml.
Der Enzymtest erfolgte gemäß der Carboanhydrasebestimmung wie vorher beschrieben.
Die Fraktionen, in denen sich größere Carboanhydraseaktivitäten befanden, wurden zur weiteren Auftrennung der Fraktionen ein zweites Mal auf die Säule gegeben. Diese Reelektrofokussierung

erfolgte meist in der Uniphorsäule.

Füllbeispiel für eine Säulenfüllung: [1 % Ampholine-Konzentration]

Dichte Lösung: 45 ml, bestehend aus:

Sucrose: 22 g

Aqua bid.:32 ml

Ampholine [40 %]: 1,5 ml

Leichte Lösung: 45 ml

Aqua bidest.: 44,5 ml

Ampholine [40%]: 0,5 ml

Proteinlsg.: 2 - 3 ml

Elektrodenlösungen:

Anodenvolumen: 42 ml

Sucrose: 25 g

Aqua bidest.: 32 ml

H_2SO_4 konz. : 0,4 ml

Kathodenvolumen: 10 ml

Aqua bidest.: 32 ml

Äthylendiaminlsg.:0,2 ml

Wenn eine Reelektrofokussierung vorgesehen war, wurde beim ersten Lauf eine Ampholine-Konzentration von 4 - 6 % eingesetzt, damit die Ampholine - Konzentration bei der Reelektrofokussierung einer Bande nicht kleiner als 1 % wurde.

Elektrofokussierung in Acrylamid - Gelen

Die Elektrofokussierung in Acrylamid-Gelen erfolgte modifiziert nach WRIGLEY.

Quarzröhrchen wurden mit 1,5 ml einer Lösung gefüllt, die unmittelbar vor Gebrauch durch Mischen von 1 Volumen einer Acrylamid - Ampholine - Lösung [22% Acrylamid, 0,6 % N,N'-Methylenbisacrylamid, 0,19 % N,N,N',N'-Tetramethyläthylendiamin, 4 % Ampholine des entsprechenden pH-Bereiches] mit 3 Volumen einer 0,1 %-igen Ammoniumpersulfatlösung erhalten worden war. Die Polymerisation erfolgte während 30 Minuten bei Zimmertemperatur. Die Elektrofokussierung fand im analytischen Säulenelektrophoresegerät der Firma Shandon statt. [Im Kühlraum bei + 2^{o}C]. Im oberen Elektrodengefäß befand sich eine 0,4 %-ige Äthylendiaminlösung, im unteren Elektrodengefäß 0,2 %-ige Schwefelsäure. 0,2 ml der Enzymlösung, die 10 % Sucrose und 1 mM 1-Dimethylamino-naphtalin-5-sulfonamid [DNSA] enthielt, wurden unmittelbar auf das Gel geschichtet. Darüber wurde vorsichtig die Äthylendiaminlösung gegeben. Es wurde eine Gleichspannung angelegt, die allmählich bis 350 Volt gesteigert wurde. Die Stromstärke darf 0,5 mA pro Röhrchen nicht überschreiten.

Die erforderliche Laufzeit bis zur völligen Ausbildung der einzelnen Banden betrug etwa 3 Stunden.

Die Röhrchen wurden aus der Apparatur genommen und sofort unter der UV-Lampe auf fluoreszierende Banden untersucht.

Disc-Elektrophorese

Die Disc-Elektrophorese wurde nach ORNSTEIN [1964] und MAURER [1968] im Gelsystem pH 8,9/ 7% durchgeführt.

Die mit Parafilm verschlossenen Quarzröhrchen wurden mit je 1,5 ml einer Mischung aus 1 Volumen einer Lösung, die 0,75 M Tris, 0,12 N HCl, 14% Acrylamid, 0,37% N'N'-Methylenbis= acrylamid und 0,058% N,N,N',N'-Tetramethyläthylendiamin enthielt und 1 Volumen einer 0,14 %-igen Ammoniumpersulfat= lösung gefüllt. Die Polymerisation erfolgte während 30 Minuten bei Zimmertemperatur. Über die Gele wurde dann zur Elektro= phorese 0,2 ml Enzymlösung, die als Fluoreszenzzusatz 1 mM 1 -Dimethyl-amino-naphtalin-5-sulfonamid enthielt, geschichtet.

Die Elektrophorese erfolgte im analytischen Säulenelektrophore= segerät der Firma Shandon bei $+2^{O}$ C im Kälteraum.

Als Elektrodenpuffer diente eine Lösung, die 38 mM Glycin und 5mM Tris enthielt. Die obere Elektrode wurde als Kathode gepolt.

Die Carboanhydraseaktivitäten, die Berechnung des Mittelwertes aus den einzelnen Versuchsreihen, die Ermittlung des mittleren Fehlers des Mittelwertes und die Signifikanzberechnung erfolgten mit dem Tischrechner Combitron S der Firma Diehl. Wir verwandten zur Fehlerrechnung das Diehl-Rechenprogramm Archivnummer 10328 und teilweise von P. DIETSCH[+] erstellte Zusatzprogramme.

[+]Pers. Mitteilung von P. DIETSCH.

AURBACH, G.D.,1971, Israel Journal of Medical Science,Vol.7,No.3
Mode of Action of Dibutyryl Cyclic AMP on Bone

BERNSTEIN, R.S.,1968, Biochem. Biophys. Acta 65758, 159, 367
Intracellular Distribution and Role of Carbonic Anhydrase in the Avian [Gallus domesticus] Shell Gland Mucosa.

CHASE, L.R.,AURBACH, G.D.,1967 Proc.Natl.Acad.Sci.USA,58,518
Parathyroid function and the renal excretion of 3'-5'-adenylic acid.

CHASE, L.R.,AURBACH, G.D.,1968, Science 159,545
Renal Adenyl Cyclase: Anatomically Separate Sites for Parathyroid Hormone and Vasopressin.

CHASE, L.R.,AURBACH, G.D.,1970, J.Biol Chem. 245, 1520
The effect of Parathyroid hormone on the concentration of 3'-5'- Monophosphate in skelett tissue in vitro.

CHEN, R.F.KERNOHAN, J.C.,1967, J.Biol.Chem.242, 5813
Combination of Bovine Carbonic Anhydrase with a Fluo=rescent Sulfonamide.

DAVENPORT, H.W.,WILHELMI, A.E.,1941, Proc.Soc.exper. Biol.Med. 48, 53
Renal Carbonic Anhydr .

DAVENPORT, H.W.,FISHER, R.B .1938/39, J.Physiol. 94, 16
Carbonic Anhydrase in the gastrointestinal mucosa.

DAVENPORT, H.W. 1939, J.Physiol. 97, 32
Gastric carbonic anhydrase.

DULCE, H.J.,SIEGMUND, P.,KÖRBER, F.,SCHÜTTE, E., 1960,
Hoppe Seyler's Zeitschrift f. Physiol.Chemie 320,163
Zur Biochemie der Knochenauflösung III,
Über das Vorkommen von Carboanhydrase im Knochen.

FELDBERG, W.,KEILIN, D. MANN, T. 1940, Nature 146, 651
Activity of carbonic anhydrase in relation to gastric secretion.

GEKLE, D.,KURTH, G., 1968, 6.Symposium der Gesellschaft für Nephrologie, Wien
Mikropunktionsuntersuchungen über den Einfluß von Thyrocalcitonin auf die renale Phosphatreabsorption parathyreoidektomierter Ratten.

GUDER, W.,WIESNER, W.,STUKOWSKI, B.,WIELAND, O.,1971,
Hoppe Seyler's Zeitschrift f. Physiol. Chemie 352,1319
Metabolism of Isolated Kidney Tubules.

GUDER, W.,WIELAND, O.,1972, Eur.J.Biochem. 31, 69
Metabolism of Isolated Kidney Tubules.
Additive Effects of Parathyroid Hormone and Free-Fatty Acids on Renal Gluconeogenesis.

HAGLUND, H., in "Methods of Biochemical Analysis" Vol.19
Isoelectric Focusing in pH-Gradients
A Technique for Fractionation and Characterization of Ampholytes.

HÄUSSLER, G.H.,WALDEYER, A.,1959, Acta Biol.Med.Ger.2,68

HOEBER, R.,1942, Proc.Soc.exper.Biol Med. 49, 87

Effect of some sulfonamides on renal secretion.

HOGEBOOM, G.H ,SCHNEIDER, W.C.,PALADE, G.E., 1947,

Proc.Soc.exper.Bio.Med. 65, 320

The isolation of morphologically intact mitochondria from rat liver.

HOLKE, M.,SIEGMUND, P.,1971, Abstr. Commun. 7.th Meet. Eur. Biochem. Soc. p. 252

Enhancement of renal carbonic anhydrase activity by Parathyroid hormone.

HOLKE, M.,SIEGMUND, P., 1971, FEBS-Letters, Vol.16,No.4,304

Detektion von Carboanhydrase Isoenzymen in Acryl= amidgelen mit einem fluoreszierenden Sulfonamid.

HOLTEN,H.,KENNEY, F.T., 1967, J.Biol.Chem. 242, 372

Regulation of tyrosine- α-ketoglutarate in rat liver.

HOLZER, H.,SEDLMAYER, R.G.,KIESE, M. 1956, Biochem.Z. 328, 176

Bestimmung des Blutgehaltes von Leberproben zur Korrektur biochemischer Analysen.

JOST, J.,KHAIRALLAH, E.A.,PITOT, H.C.,1968, J Biol.Chem. 243, 3057

Studies on the induction and repression of enzymes in rat liver [5].

LANGAN, T.,1970, in "Role of cyclic AMP in Cell Function".

LUTWAK-MANN, C.,ADAMS, C.E.,1969. Endocrinology 13, 26
Carbonic Anhydrase in the female reproductive tract. Occurrence, distribution and hormonal dependence.

MARCUS, R.,AURBACH, G.D.,1969, Endocrinology 85, 801
Bioassey of parathyroid hormone in vitro with a stable preparation of adenyl cyclase from rat kidney.

MAREN, T.H.,ELLISON, A.C.,1967, Molecul.Pharma. Vol.3,No.6
A Study of Renal Carbonic Anhydrase.

MAURER, H.R.,1968, aus "Discelektrophorese, Theorie und Praxis der diskontinuierlichen Polyacrylamid-Elektrophorese. [W. de Gruyter, Berlin,] p.39

MELDROUM, N.U.,ROUGHTON, F.J.W.,1933, J.Physiol.80, 113
Carbonic anhydrase, its preparation and properties.

MELSON, G.L.,CHASE, L.R.,AURBACH, G.D.,1970, Endocrinology 86, 511
Parathyroid hormone sensitive adenyl-cyclase in isolated renal tubules.

MINKIN, C.,JENNINGS, J.M.,Science, Vol.176, 1031, 1972
Carbonic Anhydrase and Bone Remodeling:
Sulfonamide Inhibibition in Organ Culture.

PITTS, R.F.,ALEXANDER, R.S.,1945, Am.J.Physiol. 144, 239
The nature of the renal tubular mechanism for acidifying the urine.

POCKER, Y., MEANY, J. E., 1965, Biochemistry, 4, 2535

The Catalytic Versatility of Erythrocyte Carbonic Anhydrase. I. Kinetic Studies of the Enzyme-Catalyzed Hydration of Acetaldehyde.

ORNSTEIN, L., ANN, N.Y., 1964, Acad. Sci. 121, 321

POTTER, V.R., El VEHJEM, O.A., 1936, J. Biol. Chem. 114, 495

A modified method for the study of tissue oxidations.

RAISZ, L.G., NIEMANN, I., 1967, Nature, 214, 436

Early effects of parathyroid hormone and thyrocalcitonin on bone in organ culture.

RASMUSSEN, H., TENENHOUSE, A., 1968, Proc. Soc. Acad. Sci. USA 59, 1364

Cyclic Adenosine Monophosphate, Ca^{++} and Membranes.

RASMUSSEN, H., PECHET, M., FAST, D., 1968, J. Clin. Invest. 47, 1843

Effect of Dibutyryl Cyclic Adenosine 3'-5'-Monophosphate, Theophylline and other Nukleotides upon Calcium and Phosphate Metabolism.

RASMUSSEN, H., ARNAUD, C., HAWKER, C., 1964, Science 144, 1019,

Actinomycin D and the response to parathyroid hormone.

ROSEN, S., 1972, Histochemical Journal, 4, 35

Localization of carbonic anhydrase activity in the vertebrate nephron.

ROUGHTON, F.J.W.,1935, Physiol.Rev. 15, 241

Recent work on carbon dioxide transport in the blood.

ROUGHTON. F.J.W..BOOTH, V.H.,1946.Biochem.J. 40, 319

The effects of substrate concentration,pH and other factors upon the activity of carbonic anhydrase.

RUSSEL, pers.Mitteilung an AURBACH, zitiert aus :

AURBACH, G.D. et.al. Israel J.Med.Sci. Vol.7,No.3, 1971

Hormonal Regulation of Cyclic 3'-5'-AMP in Specific Receptor Tissues.

SIEGMUND, P.,BAUDITZ, W..1965. Arch.exper.Path.u.Pharm. 251, 288

Die Wirkung von Azetazolamid auf den Anstieg der Plasma-Calcium-Werte nach Parathormon.

SIEGMUND, P..DULCE, H.J.,KÖRBER. F..SCHÜTTE, E.. Naturwissenschaften 46, 358

Über den Einfluß von Carboanhydraseinhibitoren auf erhöhte Plasma-Calcium-Werte und das Vorkommen von Carboanhydrase [CAH] im Epiphysenknorpel und Knochen.

SUTHERLAND, E.W., 1972, Science, Vol.177, 401,

Studies on the Mechanism of Hormone Action,

SUZUKI, S.,OGAWA, E.,1971,Biochem.Pharm.Vol.20,759

Experimental Studies on the Carbonic Anhydrase Activity XIII Effect of Aldosterone and Actinomycin D in vivo on renal and hepatic carbonic anhydrase in mice.

SUZUKI, S.,OGAWA,E.,1971, Biochem.Pharm. Vol. 20, 772
Experimental Studies on the Carbonic Anhydrase Activity XIV
Effect of Aldosterone and Actinomycin D in vitro on
Carbonic Anhydrase from liver and kidney of mice.

SCHULTZ, G.,JAKOBS, K.H.,BÖHME, E.,SCHULTZ, K.,1971
Eur. J.Biochem. 24, 520
Einfluß verschiedener Hormone auf die Bildung von
Adenosin-3'-5'-monophosphat und Guanosin-3'-5'-
monophosphat durch partikuläre Präparation aus der
Rattenniere.

SCHULTZ, G.,1972, Der Internist, 13, 159
Die Bedeutung von cyklischem AMP bei Hormonwir=
kungen.

TASHIAN, R.E.,DOUGLAS, D.P.,YU, Y.L., 1964,Biochem.
Biophys. Res. Comm. 14, 256
Esterase and Hydrase Activity of Carbonic Anhydrase-I
from Primate Erythrocytes.

VAN GORR, H., 1940, Enzymologia 8, 113
Die Verteilung und Verbreitung der Carboanhydrase.

WAITE, L.C.,VOLKERT, W.A.,KENNY, A.D.,Endocrinology
Vol. 87,No.6, 1129, 1970
Inhibition of Bone Resorption by Azetazolamide in
the Rat.

WAYGOOD, E.R.,1955, in "Methods of Enzymology", eds. COLO= WICK, S.P., KAPLAN, N.O., Bd.2 pp 836
Carbonic anhydrase [plant and animal].

WELLS, H.,LLOYD, W.,1968, aus " Parathyroid Hormone and Thyrocalcitonin", eds. TALMAGE, R.V., BELANGER, L.F.
Possible involvement of cyclic AMP in the actions of thyrocalcitonin and parathyroid hormone.

WELLS, H.,LLOYD, W.,1968, Endocrinology, 82, 468
Inhibition of the Hypercalcemic Action of Thyrocalcitonin by Theophylline and Isoproterenol.

WELLS, H.,LLOYD, W., 1968, Endocrinology 83, 521
Hypocalcemic Effect of Imidazole in Rats.

WELLS, H.,LLOYD, W., 1969, Endocrinology 84, 861
Hypercalcemic and Hypophosphatemic Effects of Dibuty= ryl Cyclic AMP in Rats after Parathyroidectomy.

WELLS, H.,LLOYD, W.,1967, Endocrinology 81, 139
Effects of Theophylline on the serum calcium of rats after parathyroidectomy and administration of parathy= roid hormone.

WILBUR, K.M., ANDERSON, N.G.,1948, J.Biol.Chem. 176, 147
Electrometric and colorimetric determination of carbonic anhydrase.

WISTRAND, P.J.,RAO, S.N.,1968, Biochem.Biophys.Acta 154, 130
Immunology and kinetic Properties of Carbonic Anhydrase.

WRIGLEY, C., 1968, Science Tools, Vol. 15, No.2
Gel - Electrofocusing - a Technique for analyzing multiple Protein Samples by Isoelectric Focusing.

WOMBACHER, H.,KÖRBER, F.,1972, Z.Klin.Chemie u.klin.Biochemie, 10. Jg. pp 260 - 266
A simple Competetive Protein-Binding Assay for Cyclic Adenosine 3'- 5'- monophosphate.

Ergänzungen zu den Literaturzitaten:

KARLER, R.,WOODBURG, D.R., 1960,Biochem.J. 75, 538
Intracellular Distribution of Carbonic Anhydrase.

ORLOFF, J.,HANDLER, J.S., J.Clinic. Invest. 41, 702
The similarity of Effects of Vasopressin, Adenosine - 3'- 5'- Phosphate [cyclic AMP] and Theophylline on the Toad Bladder.

SIEGMUND, P.,DULCE, H.J., 1960, Hoppe Seyler's Z. f. physiol. Chemie, Bd. 320, 149
Zur Biochemie der Knochenauflösung I
Einfluß des Carboanhydratase-Inhibitors 2-Acetamino-1,3,4-thiodiazol-sulfonamid-[5] [Diamox] auf den Calciumstoffwechsel von Legehennen.

WEBER, G., 1952, Biochem. J. 51, 155
Polarization of the Fluorescence of Macromolecules. Fluorescent Conjugates of Ovalbumin and Bovine Serum Albumin.

Lebenslauf

Am 15. Januar 1947 wurde ich, Monika Evelyn Holke, als Tochter der Sekretärin Gerta Holke in Berlin-Mariendorf geboren.

Von 1953 - 1959 besuchte ich die 4. Grundschule des Bezirkes Tempelhof und von 1959 - 1963 das Askanische Gymnasium in Berlin - Tempelhof.

Von 1963 - 1966 ging ich auf das Ernst - Moritz - Arndt - Gymnasium in Berlin - Dahlem, wo ich im März 1966 die Reifeprüfung bestand.

Im Sommerhalbjahr 1966 absolvierte ich ein Praktikum der Krankenpflege und wurde zum Wintersemester 1966/67 an der Freien Universität Berlin zum Studium der Humanmedizin zugelassen.

Im August 1967 bestand ich die "naturwissenschaftliche Vorprüfung", im Sommer 1969 die "ärztliche Vorprüfung" und im Winterhalbjahr 1972/73 die "medizinische Staatsprüfung".

Während der klinischen Semester war ich als studentische Hilfskraft am Physiologisch Chemischen Institut der F.U.B. beschäftigt. Dort bin ich auch zum jetzigen Zeitpunkt tätig.

Druck:

Der Präsident der Freien Universität Berlin
- Universitätsdruckerei -

1 Berlin 41, Kelchstraße 31